

- Table des matières -

<i>Remerciements</i>	6
<i>Liste des Abréviations</i>	11
<i>Liste des Figures</i>	19
<i>Résumés</i>	22
I. <i>Résumé Français</i>	23
II. <i>English Abstract</i>	25
<i>Introduction</i>	26
I. <i>La Grossesse Humaine</i>	27
A. <i>Le tractus reproducteur féminin</i>	27
1. <i>Ovaires</i>	28
2. <i>Utérus</i>	29
B. <i>L'endomètre</i>	30
1. <i>Phase menstruelle</i>	31
2. <i>Phase proliférative</i>	31
3. <i>Phase sécrétoire</i>	32
C. <i>L'implantation embryonnaire</i>	33
1. <i>Adhésion du blastocyste</i>	33
2. <i>Invasion trophoblastique</i>	34
D. <i>Le développement placentaire</i>	35
1. <i>Mise en place des villosités choriales</i>	35
a. <i>Lignée villeuse</i>	37
b. <i>Lignée extravilleuse</i>	37
2. <i>Le placenta au premier trimestre de grossesse</i>	38
3. <i>Mise en place de la placentation hémochoriale</i>	39
E. <i>Les interfaces materno-fœtales</i>	40
F. <i>Les fonctions de la decidua basalis</i>	41
1. <i>Fonction d'ancrage</i>	41
a. <i>Décidualisation primaire</i>	42
b. <i>Décidualisation secondaire</i>	42



2.	<i>Fonction nourricière</i>	43
3.	<i>Fonction sécrétrice</i>	45
G.	<i>Les Fonctions du placenta</i>	47
1.	<i>Fonction d'échange</i>	47
2.	<i>Fonction protectrice</i>	49
a.	<i>Interférons (IFN)</i>	49
b.	<i>Exosomes et miARN</i>	51
3.	<i>Fonction sécrétrice</i>	52
H.	<i>Les modèles animaux de placentation</i>	53
I.	<i>Les pathologies de la grossesse</i>	54
1.	<i>Pathologies non infectieuses</i>	54
a.	<i>Pré-éclampsie</i>	54
b.	<i>Retard de croissance in utero (RCIU)</i>	55
c.	<i>Placenta accreta</i>	56
2.	<i>Pathologies infectieuses</i>	57
a.	<i>Toxoplasmose</i>	57
b.	<i>Others</i>	57
c.	<i>Rubéole</i>	57
d.	<i>Cytomégalovirus humain (HCMV)</i>	58
e.	<i>Herpès</i>	59
II.	<i>Le Système Immunitaire</i>	60
A.	<i>Présentation générale</i>	60
1.	<i>Immunité innée</i>	61
2.	<i>Immunité adaptative</i>	61
B.	<i>Les cellules Natural Killer (NK)</i>	62
1.	<i>Développement des cellules NK</i>	63
a.	<i>Etapes du développement des cellules NK</i>	63
b.	<i>Facteurs de transcription</i>	65
c.	<i>miARN et contacts cellulaires</i>	66
d.	<i>Education des cellules NK</i>	66
2.	<i>Les récepteurs des cellules NK et leurs ligands</i>	68
3.	<i>Signalisation des récepteurs NK</i>	78
a.	<i>Molécules CD3ζ, FcεRIγ et DAP12</i>	79
b.	<i>Molécule DAP10</i>	80
c.	<i>Molécules adaptatrices du récepteur 2B4</i>	81
d.	<i>Récepteurs inhibiteurs</i>	81
4.	<i>Fonctions effectrices des cellules NK</i>	82

a.	Mise en place de la synapse immunologique.....	82
b.	Fonction cytotoxique médiée par les granules lytiques	84
c.	Cytotoxicité médiée par les récepteurs à domaine de mort.....	86
d.	Fonction sécrétrice des cellules NK	88
e.	Fonction adaptative des cellules NK	88
5.	<i>Cellules NK et réponse anti-tumorale</i>	89
6.	<i>Cellules NK et transplantation</i>	91
7.	<i>Cellules NK et infections virales</i>	91
C.	<i>Les Macrophages</i>	95
1.	<i>Développement et homéostasie des macrophages</i>	95
a.	Monocytes sanguins circulants	96
b.	Macrophages tissulaires résidents	97
2.	<i>Polarisation des macrophages</i>	98
3.	<i>Fonctions des macrophages durant l'inflammation</i>	99
a.	Phase I : Activation des macrophages résidents.....	99
b.	Phase II : Recrutement des monocytes	100
c.	Phase III : Elimination des cibles	100
d.	Phase IV : Résolution de l'inflammation.....	102
D.	<i>Les Lymphocytes T (LT)</i>	103
1.	<i>Le développement des LT</i>	103
2.	<i>L'activation des LT naïfs</i>	104
a.	Signal 1 : Interaction TCR/CMH/peptide	105
b.	Signal 2 : Molécules de costimulation	105
c.	Signal 3 : Polarisation des LT par les cytokines	106
3.	<i>Mise en place de la mémoire des LT</i>	108
E.	<i>L'immunité au niveau de la decidua basalis</i>	109
1.	<i>Les cellules NK déciduales (dNK)</i>	110
a.	Phénotype des cellules dNK	110
b.	Fonction sécrétrice des cellules dNK	111
c.	Communication avec les trophoblastes.....	113
d.	Fonction cytotoxique des cellules dNK.....	113
e.	Origine des cellules dNK.....	115
2.	<i>Les macrophages déciduaux (dM)</i>	117
a.	Phénotype des dM.....	117
b.	Fonctions des dM	117
3.	<i>Mécanismes de la tolérance foetale</i>	118
III.	<i>Les infections virales par l'Hépatite E et Zika</i>	122

A.	<i>Le virus de l'Hépatite E</i>	122
1.	<i>Généralités sur le VHE</i>	122
a.	Génotypes viraux	122
b.	Transmission du VHE	123
c.	Protéines virales du VHE	124
d.	Structure du VHE	126
e.	Cycle réplcatif du VHE	127
2.	<i>Pathogenèse du VHE</i>	128
a.	Diagnostic	128
b.	Infection aigüe	129
c.	Infection chronique chez l'immunodéprimé	129
d.	Manifestations extra-hépatiques du VHE	130
3.	<i>Pathogenèse du VHE durant la grossesse</i>	130
4.	<i>La réponse immunitaire contre le VHE</i>	132
a.	Réponse innée contre le VHE	132
b.	Réponse adaptative contre le VHE	135
5.	<i>Les modèles d'infection par le VHE</i>	136
a.	Modèles cellulaires in vitro	136
b.	Modèles animaux	137
B.	<i>Le virus Zika</i>	138
1.	<i>Découverte et propagation du virus Zika</i>	138
2.	<i>Réplication du génome viral</i>	139
3.	<i>Transmission du ZIKV</i>	140
a.	Transmission vectorielle	140
b.	Transmission sexuelle	140
c.	Transmission sanguine	141
d.	Transmission materno-fœtale	141
4.	<i>Pathogenèse du ZIKV à l'interface mère-fœtus</i>	142
5.	<i>Conséquences de l'infection sur le neuro-développement</i>	143
6.	<i>Récepteurs d'entrée du ZIKV</i>	144
7.	<i>ZIKV et réponse immune</i>	145
a.	Réponse immune innée	145
b.	Réponse immune adaptative	146
	<i>Objectifs</i>	148
	<i>Résultats</i>	151
I.	<i>La pathogenèse du virus de l'Hépatite E (VHE) à l'interface mère-fœtus est conditionnée par le génotype viral</i>	152

II. Infection par le virus Zika (ZIKV) durant le premier trimestre de grossesse : pathogenèse et réponse immune	195
A. Tropisme du ZIKV à l'interface mère-fœtus	195
B. Impact de l'infection par le ZIKV sur le sécrétome placentaire	208
C. Contrôle de l'infection déciduale du ZIKV par les cellules dNK	212
III. Le microenvironnement cytokinique décidual lors de la grossesse régule la fonction des cellules NK via l'épissage alternatif des récepteurs NKp30 et NKp44	218
IV. Un biais fonctionnel des lymphocytes T CD8 effecteurs mémoire sous-tend la pathogenèse exacerbée du virus de l'hépatite E chez les personnes âgées	240
Discussion	277
A. Transmission du ZIKV à l'interface mère-fœtus durant le premier trimestre de grossesse	278
B. Transmission du VHE à l'interface mère-fœtus	280
C. Perturbations du microenvironnement local lors des infections virales	282
D. Altérations de l'architecture tissulaire lors des infections virales	286
E. Rôle des IFN de type III dans le contrôle des infections congénitales	287
F. Rôle des cellules dNK dans le contrôle des infections	288
G. Importance du microenvironnement cytokinique dans la régulation de la fonction des cellules NK	291
H. Rôle des LT CD8 dans la pathogenèse du VHE-3 chez les personnes âgées ..	295
Références Bibliographiques	299
Annexes	357

Remerciements

Nous voilà (déjà ...) à la fin d'une belle aventure de 5 ans qui aura été parsemée de coups de malchance qui se seront finalement révélés chanceux.

Elle aura commencé en 2013 dans un petit village nommé « Le Fousseret » lors de la réception d'un e-mail du Dr. Hélène Coppin m'informant qu'elle ne pouvait pas me prendre en stage car je n'étais, à ce moment là, que dans la liste complémentaire du Master Immunologie et Maladies Infectieuses. Après mon acceptation définitive dans le master, elle m'a orienté vers une de ses collègues qui recherchait toujours un étudiant. C'est ainsi que j'ai rencontré le Dr. Nabila Jabrane-Ferrat avec qui j'ai fait mon M2 et passé le concours de l'école doctorale pour un financement de thèse que j'ai obtenu, ... pour une nuit. J'ai malgré tout pu m'inscrire en thèse et être financé un an par le Professeur Izopet puis pendant trois ans par l'ANRS. Vient maintenant le temps des remerciements.

Avant tout, je tiens à remercier l'ensemble des membres de mon jury, qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'évaluer mes travaux de thèse. Je remercie sincèrement mes rapporteurs, le Pr. Philip Meuleman et le Dr. Ali Amara, pour avoir évalué mon manuscrit de thèse et pour leurs nombreux commentaires positifs et encourageants sur l'ensemble de mes travaux. Je remercie également les Dr. Sophie Ugolini et Julie Tabiasco d'avoir accepté d'être examinatrices de mes travaux de thèse.

Merci également au Pr. Joost Van Meerwijk pour avoir accepté de présider mon jury de thèse, mais aussi pour m'avoir accepté en Master 2. C'est grâce à ses cours et à ceux du Pr. Denis Hudrissier que j'ai eu envie de poursuivre mon parcours dans le domaine de l'immunologie.

Le dernier membre de mon jury que je tiens tout particulièrement à remercier est également ma directrice de thèse, le Dr. Nabila Jabrane-Ferrat. Merci d'avoir accepté comme étudiant un M1 dont le seul stage en laboratoire avait consisté à apprendre à des abeilles à tirer la langue. Merci pour ta confiance et pour tout ce que tu m'as appris aussi bien sur le plan scientifique qu'esthétique et politique. J'espère pouvoir continuer à faire des figures aussi magnifiques que les tiennes (à part les modèles 3D). Ensemble, nous avons pu découvrir les joies du VHE, pour le meilleur (les PCR) et pour le pire (le pourcentage d'infection). Heureusement que le virus Zika infecte mieux. Mais bon, il ne faut quand même pas oublier qu'on est des immunologistes à la base. C'est grâce à toi Nabila que j'ai eu la chance de pouvoir découvrir les cellules NK et l'immunologie de la grossesse, domaines dans lesquels je souhaiterais poursuivre mon parcours, et pour cela je te remercie de tout cœur. Je te souhaite beaucoup de réussite dans tout ce que tu feras dans le futur, en espérant quand même que tu arrêtes de faire des petits papiers (malgré le fait qu'ils soient dans un grand

centre). Ce paragraphe commence à devenir long, mais il est difficile de résumer 5 ans en quelques lignes. Je résumerai donc l'ensemble en te disant : merci pour tout.

Après ma directrice de thèse, je voudrais remercier mon chef d'équipe, le Pr. Jacques Izopet pour son soutien moral et financier tout au long de ma thèse. C'est uniquement grâce à lui que j'ai pu avoir un financement pour ma première année de thèse, et je lui en serai éternellement reconnaissant. C'est également en intégrant son équipe que nous avons commencé à travailler sur le VHE, ce qui a permis au final de raconter une belle histoire. Je remercie également le Dr. Christian Davrinche qui a codirigé l'équipe pendant deux ans pour son soutien et sa bonne humeur constants.

Je voudrais ensuite remercier deux personnes qui m'ont énormément appris, tant sur le plan scientifique que sur les méthodes de survie au CPTP. J'espère, dans le futur, avoir l'opportunité de retravailler avec eux. Merci à Johan pour son enseignement, ses conseils et tout le temps passé à relire mon rapport de M2. Merci à Hicham (ou Hicham-El pour certains journaux) pour tout ce que tu m'as appris sur le plan scientifique mais aussi personnel. Tu m'as notamment introduit au monde merveilleux du FACS 12 couleurs. Je ne garderai que des bons souvenirs de nos soirées FACS se terminant à minuit. Grâce à toi, j'ai également eu des cours de politique et de management avancés et j'ai pu apprendre que, quel que soit l'objet de ma recherche, il existe un Libanais à Toulouse qui peut le faire. Je te souhaite beaucoup de réussite dans tous les grands projets personnels et professionnels dans lesquels tu vas bientôt te lancer. Ne stresse pas trop, tout va bien se passer.

Je voudrais ensuite remercier Qian, voilà c'est fait...

Non mais plus sérieusement, merci Qian pour ton soutien, durant ces trois dernières années. Grâce à toi j'ai pu en apprendre plus sur la Chine, tout particulièrement sur le sens de l'humour des Chinois. Malgré tout ce que tu as pu me dire (notamment shabi), cela a été un réel plaisir de travailler à tes côtés. Merci pour le soutien psychologique et expérimental. J'espère que tu pourras défendre ta thèse dans les meilleures conditions possibles. Evite quand même de boire trop de champagne. J'aurais aussi pu écrire ce paragraphe en anglais mais je n'ai aucun doute, vu ton niveau en Français, que tu comprendras tout.

Pour finir sur le groupe « Immunologie de la grossesse », je tiens à remercier les différents étudiants qui nous ont rejoints et que j'ai pu côtoyer (Hugo, Quentin, Rodolphe) ou encadrer (Paul, Nour) durant ma thèse. Enfin, merci à Ana de prendre la suite de mes travaux. Je n'ai pas encore vraiment eu le temps de bien te connaître et de travailler avec toi mais je te souhaite d'avoir une thèse aussi agréable et enrichissante que la mienne.

Je voudrais ensuite remercier mon parrain de thèse, le Dr. Daniel Dunia, ainsi que les autres membres de mon comité de suivi de thèse. Merci au Dr. Anne Quillet-Mary, Dr Cécile

Malnou et au Pr. Denis Hudrissier pour avoir suivi mes travaux de thèse et pour leur intérêt sur nos projets.

Je tiens également à remercier l'ensemble des membres de l'équipe 6 au CPTP. Merci aux Dr. Bernard Lagane, Eric Champagne et Faouzi Lakhdar-Ghazal ainsi qu'au Pr. Elmostafa Bahraoui. Bernard, malgré le fait que tu m'aie chassé du bureau, je suis convaincu que ton arrivée a donné un second souffle à l'équipe et a participé à combler la dichotomie thématique entre les versants CPTP et IFB. Merci également aux autres membres de l'équipe. Romain, même si tu viens de la campagne bleu foncé du Nord (Est) de la France, cela a été un réel plaisir de t'avoir dans l'équipe. Cela fait plaisir d'avoir quelqu'un qui comprend vos blagues nulles et qui en fait même des pires. En plus, c'est toujours bien de pouvoir parler manga et jeux vidéo avec quelqu'un. Je te souhaite plein de réussite pour le futur, et de pouvoir enfin oublier le tragique accident de ton grand-père. Merci également Marie pour ta bonne humeur et pour tout ce que tu as pu raconter. Ne te désespère pas quand les manips foirent pour la 5^{ème} fois, ça finira par marcher (comme le BRET de Romain, encore que...). Dernier petit conseil, évite de croire trop facilement ce que disent les gens, surtout si c'est Hicham, Philippe ou moi. On n'est pas méchants mais très taquins. Merci à également à Emilie, qui nous a rejoint depuis maintenant un an et qui fait régner l'ordre et la discipline dans le P2, tout en aidant continuellement l'équipe. Enfin, même si il n'est arrivé que récemment, merci à Philippe. Je ne sais pas encore pour quoi te remercier, mais comme tu le dis si bien : « Et alors ? ». Et puis c'est comme pour les cadeaux c'est l'intention qui compte.

De l'autre côté de la passerelle de l'IFB, il reste de nombreux autres membres de l'équipe que je tiens également à remercier. Merci à Florence A, Sabine, Stéphanie, Florence N, Pierre, Sébastien, Michelle, Nicolas J, Marie-Pierre, Julie, Manon, Nicolas C et Olivier. Je tiens tout particulièrement à remercier Martine pour la grande aide technique qu'elle a apporté tout long du projet VHE. Merci également à Jean-Michel et Catherine pour leur soutien et leur aide dans le projet Zika.

Merci également aux anciens membres de l'équipe pour leur soutien : Stéphane et Hélène (maintenant dans l'équipe du Dr. Dunia), Maude, Charline, Emeline, Claire, Remi, Hugo (maintenant docteurs) ainsi que Frédérique et Morgane (maintenant ailleurs).

Après mon équipe, je voudrais également remercier l'ensemble des membres du CPTP et de l'IRSD que j'ai eu la chance de pouvoir côtoyer durant les EMIT, les progress reports, les séminaires, les after-work et les (nombreuses) pauses café. Merci à l'ensemble des plateaux techniques du CPTP (cytométrie, imagerie, histologie) et des services communs, sans qui ces travaux de thèse n'auraient pas été possibles. Je remercie tout particulièrement le

magasin (Philippe et Sandrine), la laverie (Paula puis Francine) et Lydia pour leur réactivité et leur savoir-faire et leur professionnalisme. Ils nous ont sauvé la mise à de maintes reprises. Enfin, je remercie l'ensemble du personnel des maternités de l'hôpital Paule de Viguier et de la clinique Sarrus-Teinturiers pour nous avoir fourni régulièrement des échantillons précieux, sans lesquels rien n'aurait été possible.

Merci à mes anciens collègues du M2R, notamment Chloé et Manutea pour les nombreux bons moments passés au labo mais aussi en dehors. Merci également à Najet, Mélanie, Julie, Agathe, Michael, Gaëtan et Edi.

Comme il y a toujours une vie après le boulot, je remercie tous mes amis en dehors du labo qui m'ont permis de passer des soirées folles à regarder des films nuls (souvent à cause de moi d'ailleurs), à aller dans des bars, des restaurants et des escape game et de jouer à des jeux vidéos. Merci donc à Sylvain, Maxime et Vincent, les membres originaux du scooby-gang, mais aussi à Eric, Jalil, Claire et Olivia. Sans vous, la thèse aurait vraiment été moins drôle.

Pour finir, je remercie ma famille et tout particulièrement ma mère, Hélène, pour son soutien inconditionnel et permanent depuis que j'ai commencé mes études, il y a maintenant 10 ans. Si elle n'avait pas été là, je ne pense pas que j'aurais pu aller aussi loin et avec autant de succès.

Merci également à mes sœurs (Natacha, Fabienne et leurs familles), à mes tantes et mon oncle (Nanou, Arlette, Annie, Pierre et leurs familles) et à tous les autres membres de la famille ou amis (Jackie, Gérard, Josette, Giselle, Jean-Louis, Karine, Joachim, ...) pour leur soutien, leurs nombreux encouragements et leur aide tout au long de ces années.

J'aurais aimé que mon père soit également présent pour assister à ma soutenance de thèse et célébrer ce diplôme, mais la vie en a décidé autrement. C'est pourquoi je souhaiterais lui dédier ces travaux de thèse.

Enfin, je remercie Mr. Jean Luc Moudenc pour sa lettre qui nous a redonné foi dans la recherche.

Liste des

Abréviations

- A -

ADCC :	Cytotoxicité Cellulaire Dépendante des Anticorps
ALAT :	Alanine Aminotransférases
Ang-1 :	Angiopoïétine-1
ASAT :	Aspartate Aminotransférases

- B -

β2M :	β2-Microglobuline
BAT-3 :	HLA-B-Associated Transcript 3
BCG :	Bacille de Calmette-Guérin
BID :	BH3-Interacting Domain death agonist

- C -

C :	Capside
C19MC :	Chromosome 19 miRNA Cluster
CBA :	Cytometric Bead Array
CCL :	Chimiokines de type C-C
CCR :	Récepteur aux chimiokines de type C-C
CD :	Cluster de Différenciation
CIVD :	Coagulation Intravasculaire Disséminée
CLP :	Progéniteur Lymphoïde Commun
CMH :	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA :	Cellule Présentatrice d'Antigène
CT :	Cytotrophoblaste
CTEV :	Cytotrophoblaste Extravilleux
CTLA-4 :	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4
CTRL :	Contrôle
CTV :	Cytotrophoblaste Villeux
CXCL :	Chimiokines de type C-X-C
CXCR :	Récepteur aux Chimiokines de type C-X-C

- D -

DAMP :	Damage-Associated Molecular Patterns
DC :	Cellule Dendritique
DISC :	Death-Inducing Signaling Complex
dM :	Macrophages de la <i>decidua basalis</i>
DNAM-1 :	DNAX Accessory Molecule-1
dNK :	Natural Killer de la <i>decidua basalis</i>
DSC :	Cellules Stromales de <i>decidua basalis</i>

- E -

E :	Enveloppe
E4BP4 :	E4 promoter Binding Protein 4
EAT-2 :	Ewing's sarcoma-Associated Transcript-2
EBV :	Virus d'Epstein Barr
EFS :	Etablissement Français du Sang
EGF :	Epidermal Growth Factor
eNK :	Natural Killer de l'endomètre non gestant
ER :	Estrogen Receptor
ERK :	Extracellular signal-Regulated Kinases
ESCRT :	Endosomal Sorting Complexes Required for Transport
Ets-1 :	E26 transformation specific oncogene homolog-1
- F -	
FABP :	Fatty Acid Binding Protein
FADD :	Fas-Associated protein with Death Domain
FAT :	Fatty Acid Translocase
FATP :	Fatty Acid Transporter Protein
Fc :	Fragment constant des Immunoglobulines
FcγR :	Récepteur du fragment Fc des IgG
FGF :	Fibroblast Growth Factor
FL :	Flt-3 Ligand
FOXO1 :	Forkhead box protein O1
FSH :	Follicle Stimulating Hormone
- G -	
Gal-1 :	Galectine-1
GAS :	Gamma-IFN Activated Sites
GATA3 :	GATA binding protein 3
G-CSF :	Granulocyte Colony Stimulating Factor
GLUT :	Glucose Transporter
GM-CSF :	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
GvHD :	Graft versus Host Disease
GvL :	Graft versus Leukemia
Gzm :	Granzyme
- H -	
HB-EGF :	Heparin Binding-Epithelial Growth Factor
hCG :	hormone Chorionique Gonadotrope
HCMV :	CytomégaloVirus Humain
H&E :	Héματοxyline et Eosine

Hel :	Hélicase
HHV :	Human Herpes Virus
HIF :	Hypoxia Inducible Factor
HLA :	Human Leukocyte Antigen
hLP :	hormone Lactogène Placentaire
Hsp :	Heat Shock Protein
HSV :	Herpes Simplex Virus
HVEM :	Herpesvirus Entry Mediator

- I -

ICAM :	Intercellular Adhesion Molecule
ICOS :	Inducible T-cell Costimulator
Id2/Id3 :	Inhibitor of DNA binding 2/3
IDO :	Indoleamine 2,3-Dioxygenase
Ig :	Immunoglobulines
IGF :	Insulin-like Growth Factor
IL- :	Interleukine
ILC :	Cellules Lymphoïdes Innées
ILT2 :	Immunoglobulin Like Transcript 2
IFN :	Interféron
IFNAR :	Récepteur des Interférons de type I
IRF :	Interferon Regulatory Factor
ISG :	IFN-Stimulated Gene
ISRE :	IFN-Stimulated Response Element
ITAM :	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
ITIM :	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif
ITSM :	Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif

- J -

JAK :	Janus Activated Kinase
-------	------------------------

- K -

KIR :	Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor
KL :	c-Kit Ligand
KLF :	Krüppel-Like Factor

- L -

-L :	-Ligand
LAG-3 :	Lymphocyte-Activation Gene-3
LAMP-1 :	Lysosome-Associated Membrane Protein-1
LAT :	L-type Amino acid Transporter

LB :	Lymphocyte B
LFA-1 :	Lymphocyte Function-associated Antigen-1
LH :	Luteinizing Hormone
LIF :	Leukemia Inhibitory Factor
LILR :	Leucocytes Ig-Like Receptor
LRC :	Leukocyte Receptor Complex
LT :	Lymphocyte T
LT _{CM} :	LT Central Mémoire
LT _{EFF} :	LT effecteur
LT _{EM} :	LT Effecteur Mémoire
LT _{γδ} :	Lymphocyte T Gamma Delta
LT _N :	LT naïf
LTreg :	Lymphocyte T régulateur
LT _{SCM} :	LT Cellule Souche Mémoire

- M -

M1/M2 :	Macrophages de type 1/2
MAPK :	Mitogen-Activated Protein Kinases
MAVS :	Mitochondrial Antiviral Signaling protein
MCMV :	Cytomégalo virus Murin
M-CSF :	Macrophage Colony Stimulating Factor
MDA5 :	Melanoma Differentiation Associated protein 5
MEC :	Matrice Extracellulaire
MFI :	Intensité Moyenne de Fluorescence
miARN :	micro Acide Ribonucléique
MICA/MICB :	MHC class I Chain-related A/B
MML5 :	Mixed-Lineage Leukemia 5
MMP :	Matrix Metalloprotease
MOI :	Multiplicité d'Infection
MT :	Méthyltransférase
MTOC :	Centre Organisateur des Microtubules

- N -

NADPH :	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NCAM :	Neural Cell Adhesion Molecule
NCR :	Récepteurs de Cytotoxicité Naturelle
NDUFS3 :	NADH Dehydrogenase [Ubiquinone] Iron-Sulfur protein 3
NFAT :	Nuclear Factor of Activated T-cells
NK :	Natural Killer

NKC :	Natural Killer Complex
NKR :	Récepteurs des cellules Natural Killer
NKT :	Natural Killer T
NO :	Oxyde Nitrique
NS :	Protéine non structurale

- O -

ORF :	Open Reading Frame
-------	--------------------

- P -

P :	Protéase
PAI-1 :	Plasminogen Activator Inhibitor-1
PAMP :	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PBMC :	Cellules Mononucléées du Sang Périphérique
PCNA :	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PD-1 :	Programmed cell Death-1
PDGF :	Platelet-Derived Growth Factor
PfEMP-1 :	<i>Plasmodium falciparum</i> Erythrocyte Membrane Protein-1
PI3K :	Phosphoinositide 3-Kinase
PIBF1 :	Progesterone-Induced Blocking Factor 1
PKC γ :	Protéine Kinase C Gamma
PLC γ :	Phospholipase C Gamma
PLGF :	Placental Growth Factor
pNK :	Natural Killer du sang périphérique
PPR :	Région riche en Prolines
PRL-R :	Récepteur à la Prolactine
PrM :	Précurseur de Membrane
PRR :	Pattern Recognition Receptor

- R -

RAG :	Recombination Activating Gene
RCIU :	Retard de Croissance <i>In Utero</i>
RdRp :	ARN polymérase ARN dépendante
RIG-I :	Retinoic acid Inducible Gene-I
RLR :	RIG-1 Like Receptors
ROS :	Espèces Réactives de l'Oxygène

- S -

S1P :	Sphingosine-1-Phosphate
SAP :	SLAM-Associated Protein
SCID :	Severe Combined Immunodeficiency

SEM :	Erreur Standard de la Moyenne
SH2 :	SRC Homology 2
SHIP-1 :	SH2 domain-containing Inositol 5'-Phosphatase-1
SHP-1 :	SH2 domain-containing Phosphatase-1
SI :	Système Immunitaire
SIDA :	Syndrome de l'Immunodéficience Acquis
SLAM :	Signaling Lymphocyte Activation Molecule
SMAC :	Supramolecular Adhesion Complex
SNAT :	Sodium-coupled Neutral Amino acid Transporter
ST :	Syncytiotrophoblaste
STAT :	Signal Transducer and Activator of Transcription
Syk :	Spleen Tyrosine Kinase

- T -

TAM :	Tyro3, AXL, Mer
TCR :	T Cell Receptor
TGF- β :	Transforming Growth Factor Beta
Th :	Lymphocyte T Helper
TIM :	T cell Ig and Mucin domain
TIMP :	Tissue Inhibitor of Metalloproteases
TORCH:	Toxoplasmosis, Others, Rubella, Cytomegalovirus, Herpes
TLR :	Toll-Like Receptors
TNF- α :	Tumor Necrosis Factor Alpha
TRAF :	TNF Receptor Associated Factor
TRAIL :	TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand
TRF :	Tractus Reproducteur Féminin
TRIF :	TIR domain containing adapter inducing IFN beta
TSG :	Tumor Suceptibility Gene
TYK :	Tyrosine Kinase

- U -

UI :	Unités Internationales
ULBP :	UL16 Binding Protein
uPA :	urokinase Plasminogen Activator
UV :	Ultraviolets

- V -

VEGF :	Vascular Endothelial Growth Factor
VHA :	Virus de l'Hépatite A
VHB :	Virus de l'Hépatite B

VHC :	Virus de l'Hépatite C
VHE :	Virus de l'Hépatite E
VHE _E :	Forme pseudo-enveloppée du VHE
VIH :	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VZV :	Varicella Zoster Virus
- X -	
XIAP :	X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein
- Z -	
ZAP70 :	Zeta chain-associated protein of 70 kDa
ZIKV :	Virus Zika
ZIKV ^H :	ZIKV High replication
ZIKV ^L :	ZIKV Low replication

Liste des

Figures

Figure 1 : Anatomie du Tractus Reproducteur Féminin (TRF)	28
Figure 2 : Les stades de développement des follicules ovariens	29
Figure 3 : Organisation de l'utérus humain	30
Figure 4 : Régulation du cycle menstruel par les hormones ovariennes	31
Figure 5 : Les différentes phases de l'implantation embryonnaire humaine	33
Figure 6 : Développement et structure des villosités choriales.....	36
Figure 7 : Invasion de la décidua par les CTEV endovasculaires	38
Figure 8 : Remodelage des artères spiralées maternelles	39
Figure 9 : Schéma de l'utérus gestant à la fin du 1 ^{er} trimestre de grossesse	40
Figure 10 : Mise en place de la nutrition histiotrophe	44
Figure 11 : Sécrétion apocrine par les cellules glandulaires	45
Figure 12 : Signalisation induite par les Interférons de type I, II et III	50
Figure 13 : Pathogenèse de la pré-éclampsie	55
Figure 14 : Pathogenèse du placenta accreta et stades de la pathologie	56
Figure 15 : Les cellules de l'immunité innée et adaptative	61
Figure 16 : Caractéristiques des cellules NK CD56 ^{bright} et CD56 ^{dim}	62
Figure 17 : Développement des cellules NK.....	64
Figure 18 : Différenciation des cellules NK CD56 ^{bright} en CD56 ^{dim}	65
Figure 19 : Modèles d'éducation des cellules NK	68
Figure 20 : La grande diversité des Récepteurs NK (NKR).....	69
Figure 21 : Les récepteurs KIR et leurs ligands	71
Figure 22 : Structure des Récepteurs de Cytotoxicité Naturelle.....	73
Figure 23 : Signalisation induite par la molécule adaptatrice DAP12	79
Figure 24 : Signalisation induite par la molécule adaptatrice DAP10	80
Figure 25 : Signalisation par le co-récepteur 2B4	81
Figure 26 : Signalisation inhibitrice médiée par les motifs ITIM.....	82
Figure 27 : Mise en place de la synapse immunologique.....	83
Figure 28 : Signaux régulant la fonction cytotoxique des cellules NK	84
Figure 29 : Mécanismes d'apoptose déclenchés par le granzyme B.....	86
Figure 30 : Signalisation déclenchée par les récepteurs à domaine de mort	87
Figure 31 : Développement des macrophages	96
Figure 32 : Distribution et fonctions des macrophages tissulaires.....	97
Figure 33 : La polarisation M1/M2 des macrophages	98
Figure 34 : Rôle des macrophages durant l'inflammation	99
Figure 35 : Réponse inflammatoire et réparatrice des macrophages	101
Figure 36 : Les étapes de la phagocytose	102
Figure 37 : Développement thymique des lymphocytes T.....	103

Figure 38 : Les trois signaux nécessaires à l'activation des LT.....	105
Figure 39 : La polarisation des LT CD4 par les cytokines	107
Figure 40 : Modèle de différenciation progressive des LT.....	108
Figure 41 : Représentation schématique de la <i>decidua basalis</i>	110
Figure 42 : Régulation de la placentation par les cellules dNK	112
Figure 43 : Contrôle de l'infection HCMV par les cellules dNK.....	115
Figure 44 : Mécanismes immunosuppresseurs dans la <i>decidua basalis</i>	119
Figure 45 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences complètes du VHE	122
Figure 46 : Répartition géographique du VHE	123
Figure 47 : Organisation du génome du VHE	125
Figure 48 : Cycle réplicatif du VHE	127
Figure 49 : Evolution des marqueurs sanguins durant l'infection VHE	128
Figure 50 : Voies d'induction des IFN de type I.....	133
Figure 51 : Propagation du virus Zika	138
Figure 52 : Organisation du génome viral du ZIKV	139
Figure 53 : Conséquences de l'infection par le ZIKV sur le sécrétome placentaire	209
Figure 54 : Facteurs solubles qui discriminent les explants ZIKV ^H des ZIKV ^L	211
Figure 55 : Expression des molécules de CMH-I lors de l'infection des DSC par le ZIKV ...	213
Figure 56 : Activation des cellules pNK lors de l'infection des DSC par le ZIKV	214
Figure 57 : Contrôle de l'infection par ZIKV <i>via</i> les facteurs solubles des cellules dNK.....	216
Figure 58 : Marqueurs utilisés dans la stratégie de gating des LT CD4 et LT CD8	241
Figure 59 : Pathogénicité génotype-dépendante du VHE à l'interface mère-fœtus.....	281
Figure 60 : Heatmap résumant les altérations du sécrétome des explants placentaires	283
Figure 61 : Contrôle de la transmission materno-fœtale du ZIKV par les cellules dNK	290
Figure 62 : Régulation des cellules NK par le microenvironnement cytokinique.....	293
Figure 63 : Altérations des LT CD8 _{EM} causées par le VHE-3 chez les personnes âgées	296

Résumés

I. Résumé Français

Durant la grossesse, le fœtus est séparé de la mère par le placenta qui constitue une barrière protectrice efficace. Cependant, cette barrière n'est pas totalement imperméable et permet de nombreux échanges (nutriments, hormones, déchets, ...) dans des zones bien spécifiques nommées interfaces materno-fœtales. Au niveau de ces zones, les cellules fœtales entrent en contact direct avec le sang et les tissus maternels. Parmi ces interfaces, on trouve notamment la *decidua basalis* (paroi de l'endomètre gestant) où les villosités choriales du placenta s'ancrent profondément et l'espace intervilloux où les villosités flottantes sont baignées par le sang maternel. L'accès au placenta au niveau de ces interfaces est un processus finement régulé par de nombreux mécanismes. Cependant, certains pathogènes qui infectent la mère peuvent détourner ces mécanismes, franchir la barrière placentaire et se disséminer au fœtus. La famille des pathogènes TORCH (Toxoplasmosis, Others, Rubella, Cytomegalovirus et Herpes) est la plus connue pour induire des infections congénitales. Cependant d'autres virus moins connus ou émergents sont aussi capables d'infecter les interfaces mère-fœtus et de causer des complications graves pouvant être fatales pour la mère et le fœtus. Parmi ces virus, on retrouve notamment le virus de l'Hépatite E (VHE) et le virus Zika (ZIKV).

C'est dans ce contexte que s'insèrent mes travaux de thèse qui s'articulent autour de trois axes. Dans la première partie de ma thèse, nous nous sommes intéressés à la pathogenèse du VHE et du ZIKV à l'interface mère-fœtus en identifiant les cibles cellulaires des virus et en caractérisant les conséquences fonctionnelles de l'infection. Dans la seconde partie, nous avons étudié la fonction des cellules Natural Killer déciduales (dNK), qui représentent 30% des cellules de la *decidua basalis*. Ces cellules dNK ne sont pas cytotoxiques durant une grossesse physiologique mais elles sécrètent de nombreux facteurs solubles essentiels au bon déroulement de la grossesse. Nous avons démontré que les fonctions effectrices des cellules dNK sont directement régulées et dictées par le microenvironnement décidual. De plus, nous avons découvert que les cellules dNK sont capables de détecter et de limiter l'infection des cellules stromales déciduales par le ZIKV. Enfin, dans la dernière partie, nous nous sommes intéressés à la pathogenèse de l'infection par le VHE dans un autre groupe de patients à haut risque de formes graves, les personnes âgées. Nous avons alors mis en évidence que le développement de formes sévères est associé à l'émergence d'une population de lymphocytes T CD8 caractérisée par un fort état d'activation associé à des défauts fonctionnels.

En conclusion, mes travaux de thèse ont permis de mieux comprendre la pathogenèse du VHE et du ZIKV durant la grossesse et au-delà. De plus, ils ont participé à prouver

l'importance du microenvironnement local dans le contrôle de la plasticité des cellules immunitaires.

Mots clés : Interfaces materno-fœtales ; Infection congénitale ; Réponse immunitaire ; Lymphocytes Natural Killer et T CD8 ; Virus de l'Hépatite E et Zika.

II. English Abstract

During pregnancy, the fetus is isolated from the mother by the placenta, which constitutes an efficient protective barrier. However, this barrier is not completely impermeable and allows various exchanges (nutrients, hormones, wastes ...) in specific areas called maternal-fetal interfaces. In these areas, fetal cells are in direct contact with maternal blood and tissues. Among these interfaces, we can distinguish the *decidua basalis* (gestating endometrium wall) where the placental chorionic villi are deeply anchored, and the intervillous space where the floating villi bathe in the maternal blood. The access to the placenta is a process tightly regulated by different mechanisms. However, some pathogens that infect the mother can subvert these mechanisms, cross the placental barrier, and spread to the fetus. The family of TORCH pathogens (Toxoplasmosis, Others, Rubella, Cytomegalovirus and Herpes) is best known for inducing such congenital infections. Alternatively, other less known or emerging viruses like Hepatitis E virus (HEV) and Zika virus (ZIKV) are also able to infect the maternal-fetal interface and cause severe outcomes that can be lethal for both the mother and the fetus.

It's in this context that fit my thesis work, articulated around three research axes. In the first part of my work, we focused on the pathogenesis of HEV and ZIKV at the maternal-fetal interface by identifying the cellular targets of the viruses and deciphering the functional consequences of their infection. Then, we studied the role of the decidual Natural Killer (dNK) cells, which account for 30% of total cells within the *decidua basalis*. These dNK cells are devoid of cytotoxic function in healthy conditions but they rather secrete various soluble factors that are essential for the success of pregnancy. In the second part of my work, we demonstrated that the decidual microenvironment dictates and regulates the effector functions of dNK cells. Moreover, we found that dNK cells are able to detect and limit the infection of decidual stromal cells by ZIKV. Finally, in a last part, we investigated the pathogenesis of HEV infection in another group of patients at high risk of developing serious forms, the elderly people. Thus, we highlighted that the development of severe forms is associated with the emergence of a population of CD8 T cells characterized by a high activation status associated with functional defects.

In conclusion, my thesis work has shed light on the pathogenesis of HEV and ZIKV during pregnancy and beyond. In addition, they helped to demonstrate the importance of the local microenvironment in controlling the plasticity of immune cells.

Keywords : Maternal-fetal interfaces ; Congenital infection ; Immune Response ; Natural Killer and CD8 T Lymphocytes ; Hepatitis E and Zika viruses.

Introduction

I. La Grossesse Humaine

Dans le règne animal, l'Homme fait partie du clade des mammifères qui a pour caractéristique essentielle l'allaitement des nouveau-nés. Il fait partie de la sous-classe des euthériens qui est caractérisée par le développement du placenta, un organe spécialisé dans l'apport des nutriments au fœtus.

La placentation humaine est dite hémochoriale [1]. La caractéristique principale de ce type de placentation est que les cellules du placenta fœtal envahissent en profondeur les tissus de la mère et participent au remodelage des vaisseaux sanguins. De plus, les villosités du placenta baignent dans le sang maternel contenu dans l'espace intervilloux. Pour permettre l'ensemble des phases de la placentation et le succès de la grossesse humaine, le tractus reproducteur féminin s'est parfaitement adapté au cours de l'évolution sur le plan morphologique et fonctionnel.

A. Le tractus reproducteur féminin

Le tractus reproducteur féminin (TRF) est divisé en deux parties (**Figure 1**) :

- Le TRF supérieur qui comprend les ovaires, les trompes de Fallope, l'utérus et l'endocol.
- Le TRF inférieur composé de l'exocol et du vagin.

Le TRF supérieur est recouvert d'un épithélium monostratifié, alors que le TRF inférieur est couvert d'une multicouche stratifiée et squameuse de cellules épithéliales. L'endocol est recouvert d'un épithélium monostratifié alors que l'exocol est recouvert par un épithélium pluristratifié. La zone où l'épithélium pluristratifié laisse place à l'unique couche de cellules est appelée zone de transformation.

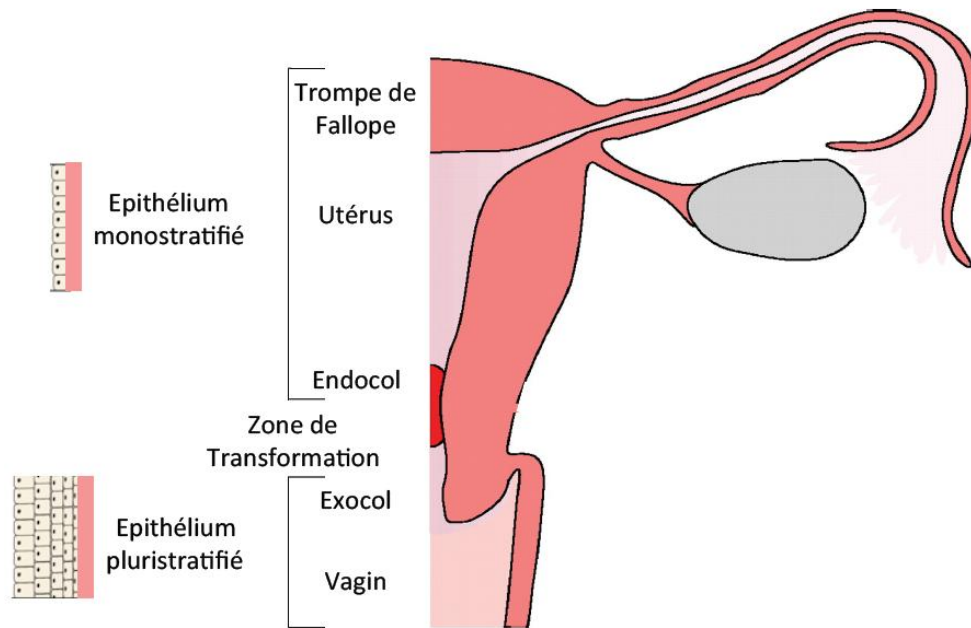
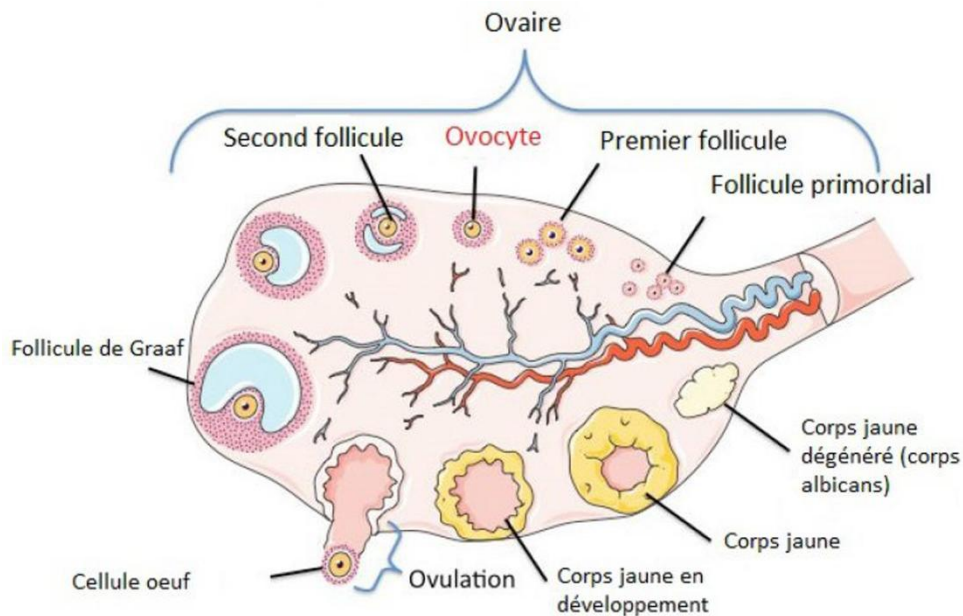


Figure 1 : Anatomie du Tractus Reproducteur Féminin (TRF). Schéma adapté de [2].

1. Ovaires

Les ovaires sont des glandes mixtes qui possèdent des fonctions exocrines (production des gamètes femelles, les ovocytes) et endocrines (sécrétion d'œstrogènes et de progestérone). Ils possèdent une région interne nommée médulla (richement vascularisée et innervée) et une région périphérique nommée cortex.

Le développement et la maturation des ovocytes se déroulent dans le cortex ovarien. Les ovocytes se développent lors du développement fœtal à partir de cellules souches femelles nommées ovogonies. Ces ovogonies diploïdes entrent en méiose et se bloquent en prophase I, formant ainsi les ovocytes primaires. Les ovocytes primaires vont ensuite s'entourer d'une couche de cellules épithéliales pour constituer les follicules primordiaux, qui constituent la réserve ovarienne. Ces follicules vont ensuite poursuivre leur développement et subir plusieurs étapes de maturation pour devenir des follicules primaires puis secondaires (**Figure 2**). Une des particularités des follicules secondaires est leur sensibilité aux hormones gonadotropes sécrétées par l'hypophyse de par leur expression des récepteurs pour la FSH (Follicle Stimulating Hormone) et la LH (Luteinizing Hormone).



Source: <https://www.neufmois.fr/le-dictionnaire-de-la-grossesse/ovocyte>

Figure 2 : Les stades de développement des follicules ovariens. Source : <https://www.neufmois.fr/le-dictionnaire-de-la-grossesse/ovocyte>.

La maturation des follicules secondaires continue à la puberté, où la sécrétion de FSH induit le recrutement d'un pool de follicules qui continuent leur maturation. Parmi ces follicules un seul sera sélectionné pour l'ovulation alors que les autres dégèneront. Ce follicule se nomme follicule dominant ou follicule de Graaf. L'ovocyte du follicule de Graaf reprend alors sa méiose et se bloque en métaphase II, formant alors un ovocyte secondaire apte être ovulé [3]. Après la libération de l'ovocyte durant l'ovulation, les cellules du follicule de Graaf se différencient en cellules lutéales pour former le corps jaune. Ce corps jaune jouera ensuite un rôle clé dans l'implantation embryonnaire en produisant des hormones sexuelles (œstrogènes et progestérone). Si l'ovocyte n'est pas fécondé, le corps jaune dégénère.

2. Utérus

Lors de l'ovulation, l'ovocyte secondaire, toujours bloqué en métaphase II, est libéré dans la trompe de Fallope. La rencontre éventuelle de l'ovocyte avec un spermatozoïde et sa fécondation déclenche la fin de la méiose. L'embryon formé commence alors son développement en subissant de nombreuses divisions cellulaires jusqu'à atteindre le stade de blastocyste, où l'embryon devient capable de s'implanter dans l'organisme maternel. Ainsi, sept jours après la fécondation, le blastocyste atteint l'utérus.

L'utérus est une poche prévue pour accueillir le blastocyste et favoriser son développement. Il est divisé en trois parties : l'endomètre, le myomètre et le périmètre (**Figure 3**). L'endomètre est la muqueuse de l'utérus. C'est un épithélium fortement vascularisé

contenant de nombreuses glandes et qui joue un rôle essentiel central dans l'implantation embryonnaire et le maintien de la grossesse. Le myomètre est un feuillet de cellules musculaires lisses impliqué dans les contractions musculaires lors de l'accouchement qui aboutissent à l'expulsion du nourrisson. Enfin, le périmètre est une couche séreuse composée de tissus conjonctifs lâches qui contient de nombreux vaisseaux lymphatiques.

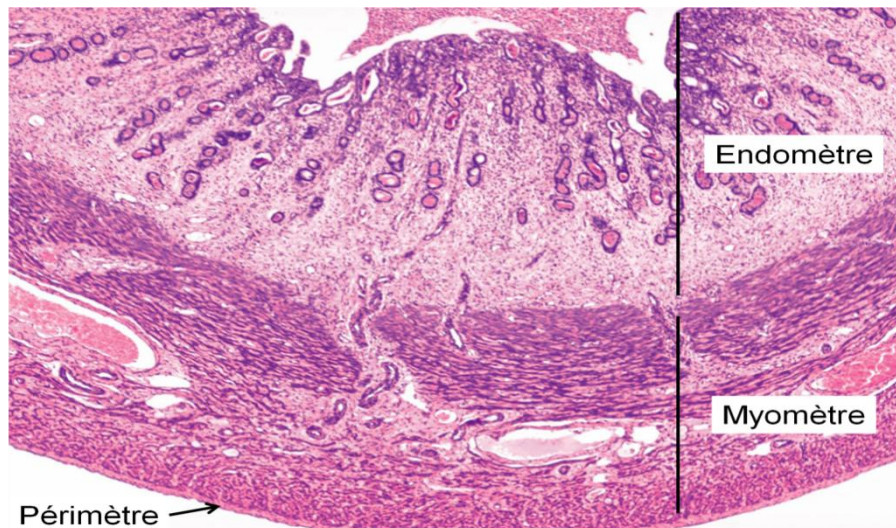


Figure 3 : Organisation de l'utérus humain. Coupe histologique marquée avec l'hématoxyline et l'éosine (H&E).

Source : http://medcell.med.yale.edu/histology/female_reproductive_system_lab.php.

B. L'endomètre

L'endomètre est un tissu constitué d'un épithélium simple et polarisé. Il est divisé en deux parties : la couche fonctionnelle et la couche basale. La zone la plus externe de l'endomètre est la couche fonctionnelle. Elle est sous l'influence directe de l'environnement hormonal et subit des modifications structurales lors du cycle menstruel.

La zone interne de l'endomètre en contact avec le myomètre est la couche basale. Elle n'est que peu modifiée durant le cycle menstruel mais joue un rôle essentiel dans la régénération des cellules de la couche fonctionnelle à chaque nouveau cycle menstruel.

Durant le cycle menstruel, l'endomètre subit un renouvellement cyclique en alternant des phases de régression, prolifération et différenciation sous l'influence des hormones hypophysaires (FSH et LH) et ovariennes (œstrogènes et progestérone). Chez la femme, le cycle menstruel « idéal » dure 28 jours et est divisé en trois phases : la phase menstruelle, la phase proliférative et la phase sécrétoire (**Figure 4**).

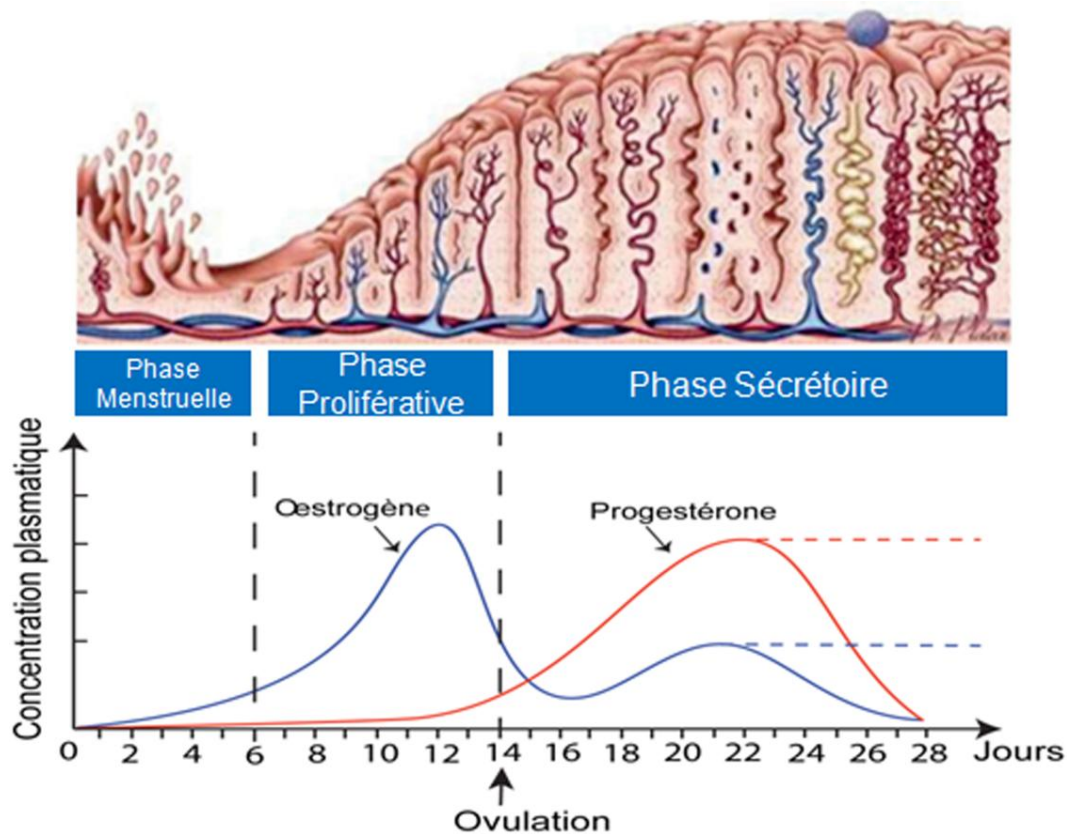


Figure 4 : Régulation du cycle menstruel par les hormones ovariennes.

1. Phase menstruelle

Le cycle menstruel débute lors du premier jour des menstruations et dure en moyenne entre trois et six jours. Si l'ovocyte atteint la cavité utérine sans avoir été fécondé, différents signaux moléculaires vont induire la dégénérescence du corps jaune par apoptose [4]. Cette dégénérescence a pour conséquence un arrêt de la production hormonale qui va causer la régression du tissu de l'endomètre, caractérisée par une vasoconstriction des artères utérines et une ischémie locale des glandes endométriales. Cette ischémie devient ensuite diffuse et induit une nécrose cellulaire massive, responsable de la régression et de l'atrophie de la couche fonctionnelle de l'endomètre [5].

2. Phase proliférative

Egalement appelée phase folliculaire, la phase proliférative dure de la fin des menstruations (jour 6) jusqu'à l'ovulation (jour 14). Elle est initiée et contrôlée par les œstrogènes sécrétés au niveau des follicules ovariens. Suite à la liaison à leur récepteur spécifique ER (Estrogen Receptor), les œstrogènes exercent divers effets dans les cellules endométriales. Ces effets permettent l'activation de voies de signalisation et de facteurs de transcription qui induisent l'expression de différentes cyclines (cycline D1, B1, E) permettant alors la progression dans

le cycle cellulaire et la prolifération des cellules endométriales [6,7]. Les œstrogènes stimulent également la transcription de gènes codant pour différents facteurs de croissance tels que l'EGF (Epidermal Growth Factor), l'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) ainsi que leurs récepteurs spécifiques [8]. Ainsi, l'épithélium luminal se reconstruit et l'épithélium glandulaire forme de nouvelles glandes qui restent rectilignes tout au long de la phase proliférative. De plus, la prolifération intense des cellules stromales induit un épaississement de l'endomètre (**Figure 4**).

3. Phase sécrétoire

Il est depuis longtemps bien établi que les œstrogènes induisent une augmentation de l'expression des récepteurs à progestérone par les cellules de l'endomètre [9]. Il est donc essentiel que l'endomètre soit sous l'influence des œstrogènes pour que la progestérone initie la phase sécrétoire, également appelée phase lutéale. Cette phase commence après l'ovulation et dure jusqu'à la fin du cycle. Contrairement aux œstrogènes, la progestérone inhibe l'expression des ER, ce qui inhibe la prolifération des cellules endométriales du stroma utérin [10]. Cet arrêt de la croissance cellulaire permet alors aux cellules endométriales de s'engager dans un processus de différenciation nommé décidualisation qui conduit à la formation de larges glandes tortueuses chargées de glycogène au sein de l'endomètre (**Figure 4**). A l'inverse, la progestérone augmente la production de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), un facteur de croissance qui stimule la prolifération des cellules endothéliales des artères utérines présentes au niveau de la couche basale de l'endomètre. Les artères spiralées utérines se développent alors en parallèle des glandes endométriales et présentent d'importantes ramifications. Enfin, la progestérone induit l'expression de différentes chimiokines nécessaires au recrutement des cellules immunitaires indispensables au phénomène de tolérance maternelle [11]. Cette tolérance immune sera développée plus en détail dans la partie II de l'Introduction.

L'endomètre est alors apte à accueillir un embryon au cours d'une courte période appelée « fenêtre implantatoire » estimée 8 et 10 jours après l'ovulation [12]. L'implantation est ensuite détectée par une sécrétion croissante d'hormone chorionique gonadotrope (hCG), synthétisée spécifiquement par les cellules trophoblastiques de l'embryon. L'hCG assure le maintien du corps jaune et de la synthèse de progestérone [13]. En absence d'embryon, le corps jaune dégénère et la sécrétion de progestérone chute brutalement déclenchant alors la phase menstruelle et l'initiation d'un nouveau cycle.

C. L'implantation embryonnaire

Au cours du développement folliculaire ovarien, une couche acellulaire appelée zone pellucide se forme entre l'ovocyte et les cellules folliculaires. Elle est constituée d'un ensemble de glycoprotéines qui jouent un rôle important lors de la fécondation en favorisant la fixation du spermatozoïde à l'ovocyte. Après la fécondation, les premières divisions cellulaires s'effectuent dans les trompes de Fallope. L'embryon est toujours entouré de la zone pellucide. Celle-ci empêche les contacts cellulaires entre l'embryon et les cellules des trompes évitant ainsi une grossesse ectopique (ou grossesse extra-utérine). Le septième jour post-fécondation, l'embryon atteint le stade blastocyste et entre dans la cavité utérine. Il se débarrasse alors de la zone pellucide au cours du processus d'éclosion, et libère l'embryon pour permettre son implantation dans l'endomètre (**Figure 5**). Suite à son éclosion, le blastocyste entre en contact avec la paroi de l'utérus par l'intermédiaire des trophoblastes qui l'entourent. Si l'utérus a atteint un état de réceptivité, alors l'implantation embryonnaire peut avoir lieu. Elle est divisée en deux phases : l'adhésion du blastocyste et l'invasion trophoblastique.

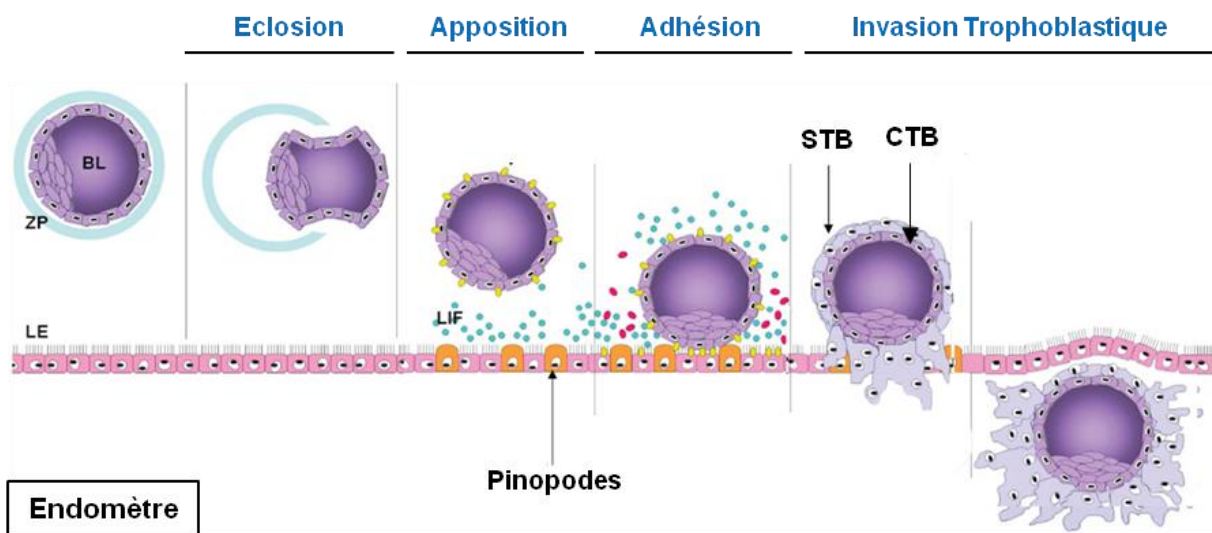


Figure 5 : Les différentes phases de l'implantation embryonnaire humaine. BL : Blastocyste ; ZP : Zone Pellucide ; LE : Epithélium Luminal ; LIF : Leukemia Inhibitory Factor ; CTB : Cytotrophoblaste ; STB : Syncytiotrophoblaste. Adapté de [14].

1. Adhésion du blastocyste

La réceptivité utérine correspond à la période durant laquelle l'épithélium endométrial est apte à accueillir un embryon. En effet, en dehors de cette « fenêtre implantatoire », l'endomètre constitue un environnement non réceptif et totalement réfractaire à l'embryon. Lors de l'implantation embryonnaire l'épithélium luminal de l'endomètre entre en contact

direct avec le blastocyste. Cet épithélium est composé de cellules épithéliales polarisées. Le pôle basal repose sur le stroma utérin et permet l'échange de signaux moléculaires avec l'endomètre décidualisé (ou decidua) ou les vaisseaux sanguins. Les membranes latérales des cellules forment des jonctions serrées qui assurent la cohésion de l'épithélium. Enfin, le pôle apical joue un rôle clé dans les interactions avec le blastocyste.

La première phase de l'implantation correspond à l'apposition du blastocyste sur l'épithélium endométrial (**Figure 5**). Elle commence par l'orientation du blastocyste qui place son pôle embryonnaire au contact des cellules épithéliales de l'endomètre. Durant la « fenêtre implantatoire », les cellules épithéliales acquièrent un phénotype réceptif caractérisé par des modifications morphologiques sous l'influence de facteurs moléculaires ovariens, trophoblastiques et déciduaux. La présence de protrusions, nommées pinopodes, à l'extrémité apicale des cellules épithéliales facilite les interactions étroites avec les cellules du trophoblaste qui entourent l'embryon. Ces pinopodes sont des projections cytoplasmiques spécifiques de la « fenêtre implantatoire » qui apparaissent sous l'effet de la progestérone [15]. La phase d'apposition nécessite également la disparition de protéines anti-adhésion formant le glycocalyx endométrial, notamment des mucines 1 et 16 dont l'expression est contrôlée par le niveau d'œstrogènes [16].

Les premiers contacts entre l'embryon et l'endomètre se renforcent ensuite au cours de la phase d'adhésion. Bien que les mécanismes qui la déclenchent restent mal connus chez l'Homme, elle semble être initiée par la sécrétion de LIF (leukemia inhibitory factor), d'IL-1 (interleukine-1) et de HB-EGF (heparin binding-epithelial growth factor) par cellules trophoblastiques et endométriales, qui expriment également les récepteurs de ces facteurs solubles. La liaison de ces ligands à leurs récepteurs respectifs induit alors l'expression de molécules d'adhésion cellulaire (intégrines, cadhérines et sélécines) et de protéines membranaires (CD9, CD44 et CD55), créant alors de nouvelles interactions et augmentant l'adhésion de l'embryon [17,18]. D'autres protéines issues de la matrice extracellulaire (fibronectine, laminine, ...) renforcent également ces interactions [19,20].

2. Invasion trophoblastique

L'étape finale de l'implantation embryonnaire est l'invasion trophoblastique. Pendant cette étape, les interactions cellulaires et moléculaires mises en place entre le blastocyste et l'endomètre lors de l'adhésion induisent la prolifération des trophoblastes. A l'inverse, ces interactions induisent l'apoptose des cellules épithéliales endométriales via l'activation de la protéine kinase C, [16]. Enfin, le blastocyste induit la destruction des jonctions serrées de l'épithélium utérin causant alors une dissociation des cellules endométriales [21]. L'ensemble de ces mécanismes favorise l'infiltration des cellules trophoblastiques au sein du stroma

endométrial au cours d'un processus nommé « nidation ». A ce stade, le trophoblaste primitif se différencie en deux couches cellulaires distinctes : le cytotrophoblaste mononucléé périphérique et le syncytiotrophoblaste multinucléé doté d'une activité protéolytique importante qui permet le remodelage de la matrice extracellulaire (MEC) du stroma utérin et la pénétration de l'embryon jusqu'à son enfouissement complet (**Figure 5**).

Plusieurs enzymes sont impliquées dans ce processus invasifs. Parmi ces enzymes protéolytiques, on retrouve notamment la famille des metalloprotéases (MMP) dont le rôle est essentiel à la réorganisation de la MEC [22]. Les cellules trophoblastiques et déciduales sécrètent de nombreuses MMP, mais MMP-2 et MMP-9 sont les isoformes majoritaires [23]. Elles sont toutes les deux capables de dégrader le collagène de type IV qui est le principal constituant de la MEC, facilitant ainsi l'invasion trophoblastique.

Même si elle n'est pas indispensable à l'invasion trophoblastique (l'embryon pouvant en théorie envahir d'autres tissus), la decidua joue un rôle essentiel dans la régulation de ce processus. En effet, au cours de la maturation endométriale et de l'implantation embryonnaire, la MEC du stroma utérin subit un important remodelage résultant du dialogue entre les cellules déciduales, les cellules immunitaires, les cellules vasculaires et les cellules trophoblastiques. Ces mécanismes moléculaires permettent d'avoir une invasion trophoblastique parfaitement contrôlée avec une limitation dans le temps (entre la 8^{ème} et la 18^{ème} semaine de grossesse) et dans l'espace (jusqu'au premier tiers du myomètre) [22]. Une dérégulation de l'ensemble des mécanismes, impliqués dans le contrôle de l'invasion trophoblastique, est à l'origine de grossesses pathologiques associées à une invasion insuffisante (pré-éclampsie, retards de croissance *in utero*, avortements spontanés) ou à l'inverse à une invasion excessive (placenta accreta) [24,25].

D. Le développement placentaire

1. Mise en place des villosités choriales

Après la nidation, des vacuoles apparaissent au sein de la masse embryonnaire et se développent progressivement pour former de véritables lacunes. En parallèle, les cytotrophoblastes (CT) proliférant à partir de la masse cellulaire interne, vont s'insinuer dans les travées de syncytiotrophoblaste (ST) formant ainsi des excroissances qui envahissent la paroi utérine (**Figure 6**). Puis, le mésenchyme embryonnaire pénètre dans le tronc de ces villosités primaires les transformant en villosités secondaires. Enfin, grâce à des processus d'angiogenèse, les cellules du mésenchyme se différencient en tissu conjonctif et les premiers vaisseaux sanguins fœtaux apparaissent au sein des villosités choriales alors nommées villosités tertiaires [26]. La villosité choriale, unité structurale et fonctionnelle du

placenta, a alors acquis sa structure définitive. Les lacunes placentaires sont nommées espace intervilloux. Elles sont, à ce stade, remplies de sécrétions endométriales et le resteront jusqu'à la mise en place de la placentation hémochoriale. Elles seront alors irriguées par le sang maternel qui apportera les nutriments nécessaires à la croissance fœtale jusqu'à l'accouchement. Lorsque la villosité placentaire est libre dans l'espace intervilloux, elle est qualifiée de villosité flottante. Au contraire, la villosité peut également s'ancrer dans la décidua et sera alors qualifiée de villosité ancrée ou villosité crampon. Les villosités définitives sont constituées de deux lignées cellulaires distinctes dérivées du cytotrophoblaste : la lignée villeuse et la lignée extravilleuse.

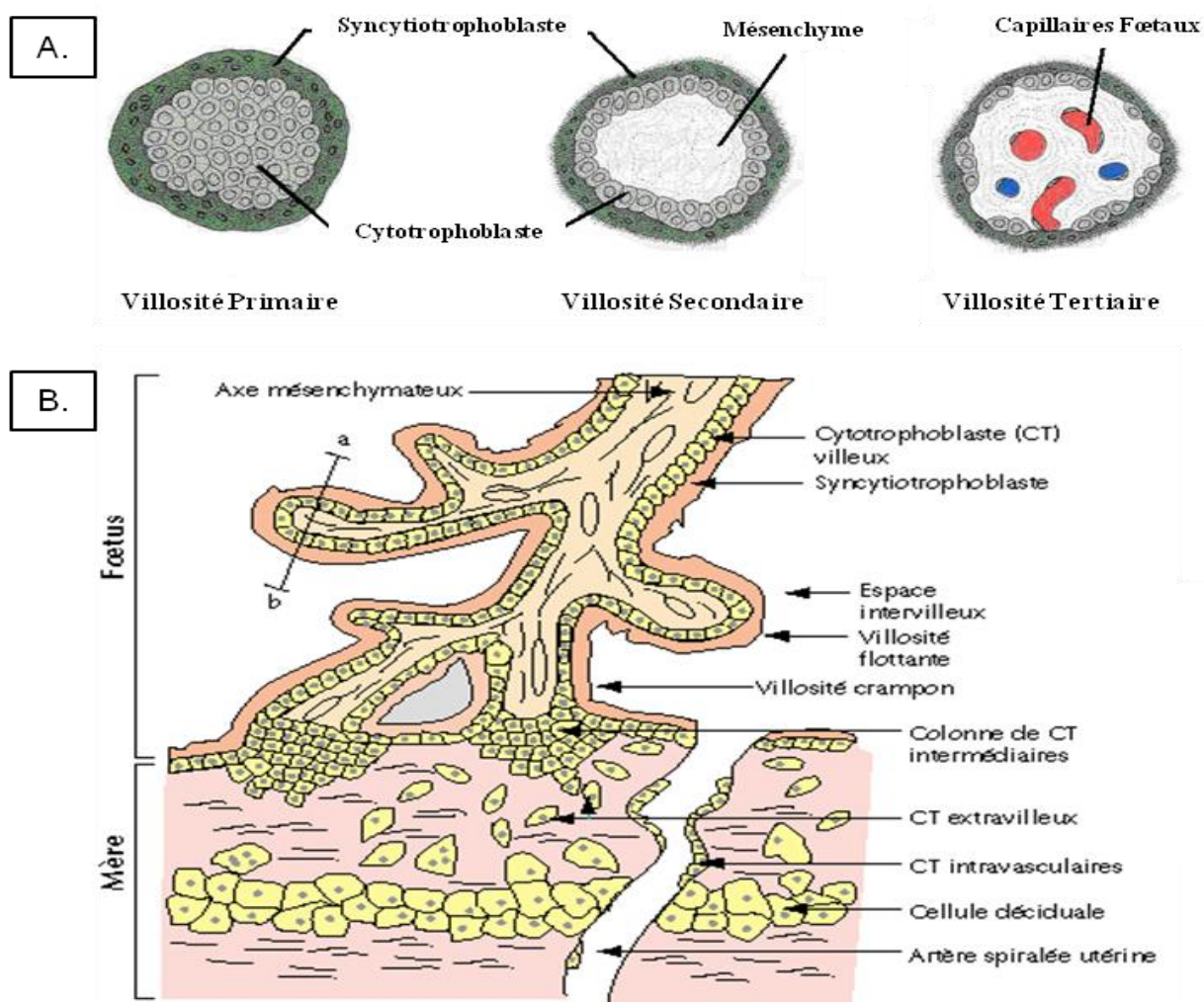


Figure 6 : Développement et structure des villosités chorales. (A.) Mise en place des villosités chorales placentaires. **(B.)** Organisation détaillée d'une villosité chorale.

Adapté de <http://www.md.ucl.ac.be/didac/anat110/Chapitre1/placenta1.png> (A.) et https://www.jle.com/fr/revues/mtp/edocs/le_placenta_humain_neuf_mois_dune_intense_acti_vite_encore_meconnue_200119/article.phtml (B.)

a. Lignée villeuse

Les cytotrophoblastes villeux (CTV) sont les cellules qui recouvrent la villosité chorale dans sa structure définitive. Elles ont pour particularité de s'agréger et de fusionner entre elles permettant alors leur différenciation en syncytiotrophoblastes (ST). Ainsi, La villosité chorale est recouverte par deux couches de cellules : une couche de CTV mononucléée et une couche de ST multinucléée (**Figure 6**). Cette dernière est en contact direct avec le sang maternel dès la fin du premier trimestre de grossesse et constitue donc une des principales interfaces materno-fœtales. La fonction principale du ST est d'assurer les échanges entre la mère et l'embryon. De manière similaire aux cellules intestinales, les ST présentent une membrane microvillositaire qui facilite la mise en place de ces échanges. De plus, de nombreux systèmes de transport actifs ou passifs permettent l'entrée de nombreuses molécules dans la villosité chorale. Enfin, le ST possède également un rôle endocrine indispensable au maintien de la grossesse ainsi qu'à la croissance et au développement du fœtus. Après avoir exercé ses fonctions, le ST meurt par apoptose. Au cours de ce processus, ses noyaux se condensent, deviennent inactifs et forment des agrégats nommés nœuds syncytiaux. Ces nœuds se détachent du syncytium et forment des débris syncytiaux polynucléés au sein de la circulation maternelle [27]. Pour compenser la perte cellulaire par apoptose, le ST est renouvelé de manière continue par la fusion des CTV sous-jacents.

b. Lignée extravilleuse

Les villosités ancrées forment des colonnes de cellules trophoblastiques polarisées, agrégées les unes aux autres et reposant sur une lame basale (**Figure 6**). Au contact du tissu décidual, les CT perdent progressivement leur potentiel prolifératif et acquièrent un phénotype invasif leur permettant de coloniser profondément le stroma utérin. Ils forment alors la population de cytotrophoblastes extravilleux (CTEV) qui migre dans la décidua, et envahit la paroi des artères utérines et l'endomètre maternel jusqu'au tiers supérieur du myomètre. Deux populations de CTEV participent au remodelage des artères spiralées utérines: les CTEV endovasculaires (ou intravasculaires) et les CTEV interstitiels. Les CTEV endovasculaires migrent en suivant la lumière vasculaire et remplacent progressivement les cellules endothéliales maternelles. Les CTEV interstitiels envahissent la muqueuse utérine, érodent la paroi des artères spiralées maternelles et assurent l'ancrage du placenta dans l'endomètre. Une fois la migration interstitielle achevée, les CTEV se différencient en cellules géantes multinucléées. La fonction de ces cellules est mal connue mais il semblerait qu'elles soient capables de sécréter des hormones spécifiques de la grossesse et d'éviter une migration excessive des CTEV dans l'endomètre [28,29].

2. Le placenta au premier trimestre de grossesse

Le placenta humain présente l'originalité de ne véritablement devenir un placenta hémochorial qu'à partir du deuxième trimestre de grossesse. Durant le premier trimestre, au cours du processus d'invasion de la decidua, les CTEV endovasculaires orientent leur migration vers les artères utérines, s'y accumulent et s'organisent en « bouchons trophoblastiques » qui obstruent l'ouverture des vaisseaux et bloquent complètement l'entrée du sang maternel dans l'espace intervilloux (**Figure 7**, panel de gauche). Une étude récente a montré que ces bouchons persistent jusqu'à la 11^{ème} semaine de grossesse [30]. Ce mécanisme permet la mise en place d'un microenvironnement hypoxique qui est capital pour le déroulement précoce de la grossesse.

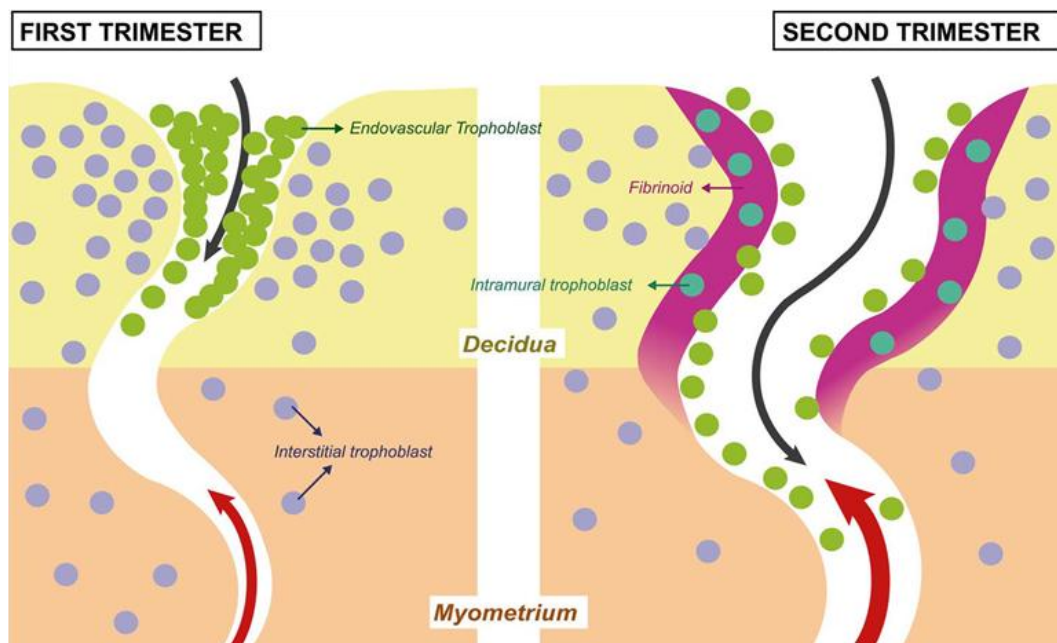


Figure 7 : Invasion de la décidua par les CTEV endovasculaires. [31].

L'hypoxie est très importante pour l'angiogenèse placentaire. En effet, elle stimule la production de facteurs de croissance pro-angiogéniques tels que le VEGF et le FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2) ainsi que l'expression des facteurs de transcription Ets-1 (E26 transformation specific oncogene homolog-1) et KLF8 (Krüppel-Like Factor 8) nécessaires à la mise en place du réseau sanguin embryo-placentaire [32,33]. A l'inverse, l'hypoxie limite la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui pourraient être délétères durant l'embryogenèse. Ainsi, elle exerce une fonction protectrice en assurant un développement placentaire normal [34]. Enfin, l'hypoxie permet de stabiliser la protéine HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1) et d'activer la sécrétion de TGF- β (Transforming Growth Factor- β). Ces facteurs stimulent la prolifération des CTV et des CTEV mais limitent leur différenciation et leur potentiel invasif au profit du développement placentaire [35,36]. Cependant, ces effets

anti-syncytialisation et anti-invasion ne sont observés qu'à partir de la 7^{ème} semaine de grossesse et ne perturbent donc pas la mise en place la villosité choriale.

3. Mise en place de la placentation hémochoriale

Dès le début de la grossesse, les artères déciduales maternelles subissent un important remodelage dirigé par le stroma décidual et les cellules immunes présentes localement (notamment les cellules Natural Killer déciduales ou dNK). Ces cellules sécrètent de nombreuses cytokines pro-apoptotiques telles que l'IFN- γ (Interféron- γ) et le TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) qui induisent la mort des cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire (**Figure 8**). Elles sécrètent également de nombreuses MMP qui digèrent la matrice extracellulaire endothéliale. Cette digestion diminue la cohésion cellulaire et induit l'apoptose des cellules endothéliales [37]. Le remodelage est renforcé par les CTEV endovasculaires des bouchons trophoblastiques, qui sécrètent spécifiquement de la MMP-12 qui participe également à déstabiliser la matrice extracellulaire endothéliale [38]. De plus, ils stimulent l'apoptose des cellules endothéliales en produisant du TNF- α et en exprimant les ligands (-L) des récepteurs de mort cellulaire Fas et TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand) [37].

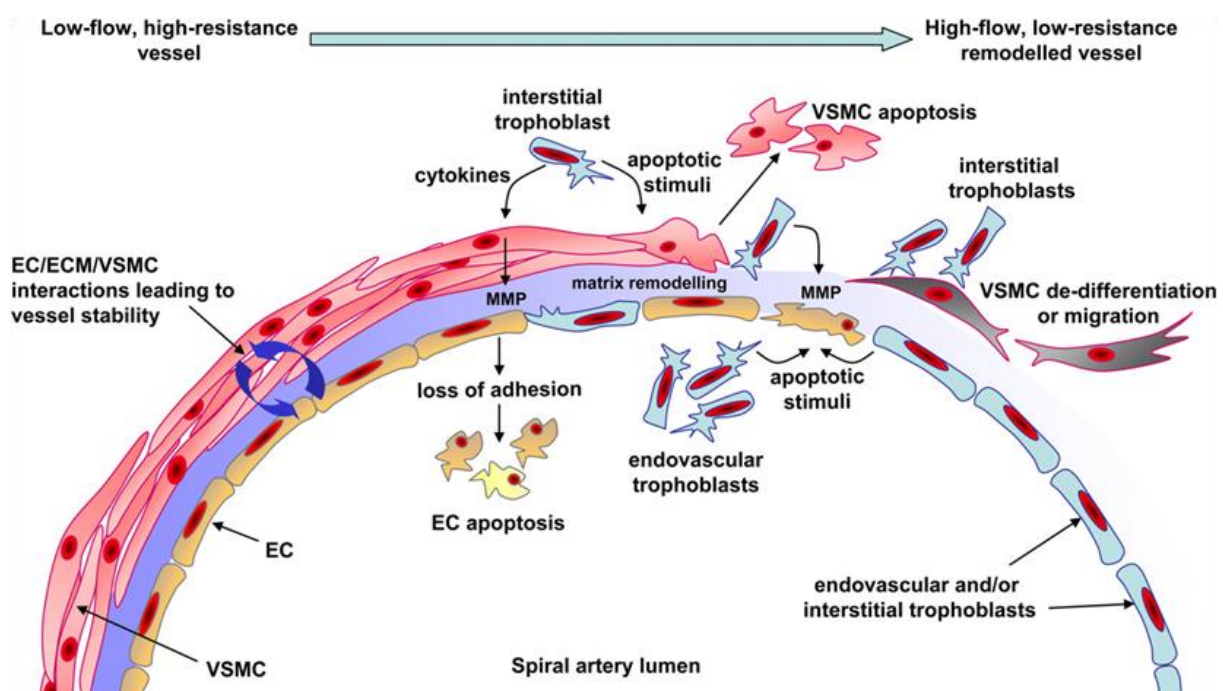


Figure 8 : Remodelage des artères spiralées maternelles. EC : Cellule endothéliale maternelle ; VSMC : Cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire ; ECM : Matrice extracellulaire ; MMP : Metalloprotéase. [37].

En parallèle de la destruction des vaisseaux maternels, les CTEV endovasculaires constituant les bouchons trophoblastiques colonisent l'endothélium. Ainsi, à la fin du premier

trimestre de grossesse les bouchons trophoblastiques se désagrègent et le sang maternel commence à remplir l'espace intervilloux. A partir de ce moment, les villosités chorales se développent en condition de normoxie et la placentation hémochoriale se met en place. L'oxygène stimule alors l'invasion trophoblastique et les CTEV se différencient en CTEV endovasculaires qui vont à leur tour coloniser les artères utérines en profondeur (**Figure 7**, panel de droite) [35,37]. En résumé, la mise en place de la placentation hémochoriale s'accompagne d'un important remodelage vasculaire des artères spiralées maternelles qui deviennent alors des vaisseaux chimériques composés de CTEV endovasculaires (**Figure 8**). Ces vaisseaux ont pour caractéristique d'avoir une faible résistance et un fort débit sanguin, ce qui permet d'augmenter l'afflux sanguin dans l'espace intervilloux et de favoriser les échanges mère-fœtus.

E. Les interfaces materno-fœtales

Trois semaines après la fécondation l'implantation embryonnaire est terminée et la villosité chorale prend sa forme définitive. Ces processus s'accompagnent de la décidualisation de l'endomètre et la formation de la décidua, qui se divise en trois tissus distincts (**Figure 9**). La *decidua basalis* correspond à la zone endométriale qui subit les nombreuses modifications associées à la grossesse dont le remodelage de la MEC lors de l'implantation et la transformation des vaisseaux sanguins lors de la mise en place de la placentation hémochoriale. En plus de la *decidua basalis*, on trouve également la *decidua capsularis*, qui recouvre l'embryon à la suite de son implantation et la *decidua parietalis*, qui correspond à l'ensemble de l'endomètre en dehors du site d'implantation.

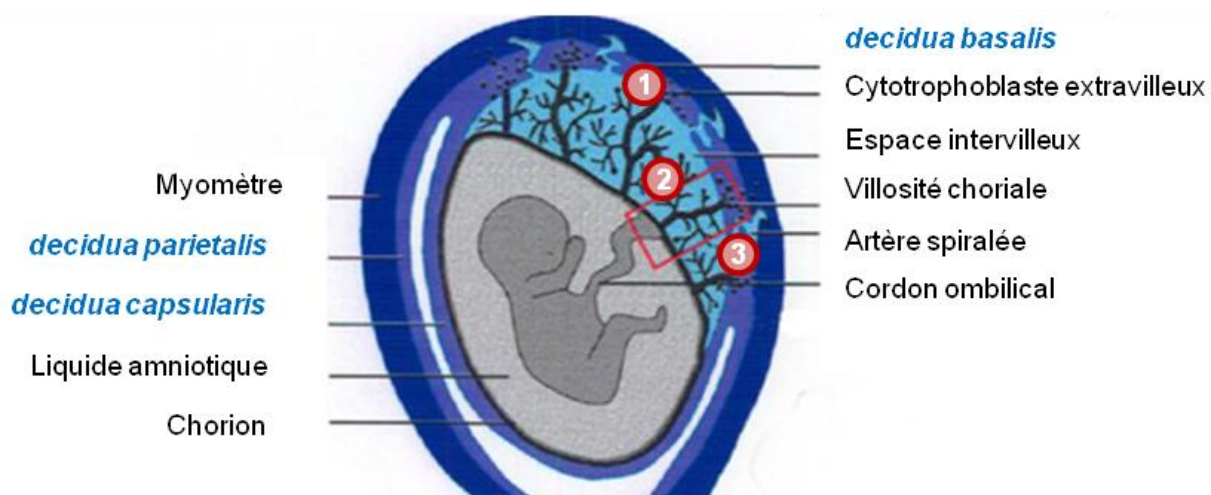


Figure 9 : Schéma de l'utérus gestant à la fin du 1^{er} trimestre de grossesse. Les chiffres représentent les différentes interfaces materno-fœtales avec 1) interface entre *decidua*

basalis et CTEV ; 2) interface entre sang maternel et ST dans l'espace intervilloux ; 3) interface entre le sang maternel et les CTEV endovasculaires. Adapté de [39].

Une grossesse saine se caractérise par un dialogue continu, soutenu et parfaitement régulé entre les tissus maternels (*decidua basalis*, sang) et fœtaux (villosités chorales ancrées et flottantes) [1]. Ainsi, le premier trimestre de la grossesse humaine permet la mise en place de zones de contact privilégiées, nommées interfaces materno-fœtales (**Figure 9**), dont les principales sont :

- 1) l'interface entre la *decidua basalis* et CTEV invasifs (interstitiels ou endovasculaires),
- 2) l'interface entre le ST des villosités flottantes et l'espace intervilloux rempli par le sang maternel,
- 3) l'interface entre les CTEV endovasculaires et le sang périphérique des artères spiralées maternelles.

C'est également au niveau de ces interfaces que l'on retrouve de nombreuses cellules immunes maternelles essentielles à la régulation du dialogue materno-fœtal et à la tolérance fœtale [40]. Les différentes populations immunes et leurs fonctions seront décrites plus en détail dans la partie II de l'Introduction. En conclusion, la mise en place des différentes interfaces permet une séparation des tissus maternels et fœtaux tout en autorisant les échanges et la communication entre eux. De plus, ils permettent l'action simultanée des fonctions de la *decidua basalis* et du placenta qui sont distinctes mais complémentaires.

F. Les fonctions de la *decidua basalis*

Durant la grossesse, la fonction principale de la *decidua basalis* est d'assurer l'ancrage du placenta. Elle participe également à la fonction nourricière de l'embryon au cours du premier trimestre de grossesse, lorsque le sang maternel n'a pas encore rempli l'espace intervilloux. Enfin, elle sécrète de nombreux facteurs solubles (cytokines, chimiokines, hormones et facteurs de croissance) qui ont une action paracrine et régulent les fonctions endométriales.

1. Fonction d'ancrage

La pénétration des trophoblastes fœtaux dans l'endomètre et jusqu'au premier tiers du myomètre, au cours de l'implantation embryonnaire humaine, est l'une des plus invasives du règne animal. L'invasion du stroma endométrial est si profonde que l'épithélium décidual est capable de se reconstruire au dessus du site d'implantation. Ce processus se nomme invasion interstitielle et nécessite une adaptation morphologique et fonctionnelle de l'endomètre en deux phases. Dans un premier temps, lors de la décidualisation primaire, l'endomètre se réorganise sous l'effet de la progestérone pour soutenir l'invasion

trophoblastique et l'ancrage du placenta [15]. Puis, après l'initiation de la phase invasive, la *decidua basalis* régule l'invasion trophoblastique par différents mécanismes durant la décidualisation secondaire.

a. Décidualisation primaire

Chez l'Homme, la décidualisation primaire est indépendante de la fécondation de l'ovocyte et à lieu à chaque cycle menstruel. Sous l'action de la progestérone sécrétée par le corps jaune, les cellules stromales de l'endomètre se différencient en cellules stromales déciduales. Ces cellules stromales déciduales sont très différentes de leurs précurseurs sur le plan morphologique et fonctionnel. Ce sont des cellules hypertrophiées avec un appareil de Golgi et un réticulum endoplasmique très développé qui sécrètent divers composants de la MEC dont la fibronectine, la laminine et le collagène de type IV. De manière intéressante, une étude a mis en évidence que ces molécules ne sont pas exprimées dans la *decidua basalis* de femmes souffrant d'infertilité inexplicée, confirmant ainsi le rôle central du remodelage de la MEC dans le bon déroulement de la grossesse [41]. De plus, au cours du processus de décidualisation, les cellules stromales déciduales acquièrent un potentiel contractile. En effet, la décidualisation modifie le cytosquelette en induisant l'expression de l'actine- α , de la vimentine et de la desmine qui augmentent la motilité des cellules stromales déciduales [42,43].

b. Décidualisation secondaire

L'invasion trophoblastique est un processus qui présente de nombreux points communs avec l'invasion tumorale. En effet, au cours des étapes de migration et de colonisation de la *decidua basalis*, le CTEV invasif à la base des villosités ancrées se comporte comme un tissu pseudo-tumoral [44,45]. De manière identique à l'invasion trophoblastique, le processus tumoral débute une forte prolifération cellulaire qui s'accompagne d'un remaniement du répertoire des intégrines et des cadhérines permettant ainsi l'acquisition de propriétés invasives [46]. Puis, les cellules progressent dans le tissu en sécrétant des MMP, orientent leur migration vers les vaisseaux sanguins, les envahissent et produisent de nombreux facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF [46,47]. Enfin, elles contrôlent le microenvironnement local et induisent une réponse tolérogène qui leur permet d'éviter d'être rejetées par le système immunitaire.

Il existe cependant une différence majeure entre les deux processus. Contrairement à l'invasion tumorale qui se fait de manière anarchique, l'invasion trophoblastique est parfaitement contrôlée de manière temporelle et spatiale. Afin d'éviter une invasion excessive des trophoblastes, les cellules stromales de la *decidua basalis*, notamment les

cellules Natural Killer (NK), sécrètent de nombreuses chimiokines qui permettent le recrutement de cellules immunitaires. Ces cellules induisent la mort des trophoblastes en sécrétant des cytokines pro-apoptotiques telles que l'IFN- γ , ce qui aura comme conséquence directe de limiter leur invasion [48]. Les cellules stromales de la décidua sécrètent également de nombreux inhibiteurs enzymatiques tels que PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1) et les TIMP (Tissue Inhibitor of Metalloproteases) qui agissent sur le remodelage de la MEC et contrôlent la progression des CTEV dans la *decidua basalis* [49,50].

Enfin, au niveau de la *decidua basalis*, les CTEV interstitiels se différencient en cellules géantes multinucléées qui perdent leur capacité invasive. Ces cellules jouent probablement un rôle important dans le contrôle de l'invasion trophoblastique car un excès du nombre de ces cellules est observé dans des placentas pré-éclamptiques ou présentant des retards de croissance *in utero* [51,52]. En revanche, un déficit en cellules géantes a été décrit dans des cas de placentas *accreta* [53]. Ainsi, la *decidua basalis* semble également pouvoir contrôler l'invasion trophoblastique en modulant la balance entre les cellules géantes non-invasives et les CTEV invasifs.

2. Fonction nourricière

Au cours du premier trimestre de grossesse, la *decidua basalis* assure la fonction nourricière de l'embryon par un processus nommé nutrition histiotrophe [54,55]. En se basant sur des mesures échographiques, il est depuis longtemps décrit que l'espace intervilloux ne contient pas de sang maternel au cours des douze premières semaines de grossesse [56]. Ainsi, avant la disparition des bouchons trophoblastiques, l'embryon n'est pas en contact avec le sang maternel. Il est alors totalement dépendent des sécrétions des glandes tortueuses de la *decidua basalis* pour assurer sa nutrition. De manière similaire aux artères spiralées maternelles, la sécrétion endométriale nécessite la colonisation des glandes déciduales par les CTEV invasifs (**Figure 10**). Une étude *in vivo*, réalisée dans un modèle ovin, a montré que l'ablation des glandes endométriales ne perturbe pas l'implantation embryonnaire [57]. En revanche, la gestation s'arrête de manière prématurée suite à des défauts de croissance fœtale, suggérant un rôle majeur des sécrétions endométriales durant les premiers stades de la gestation.

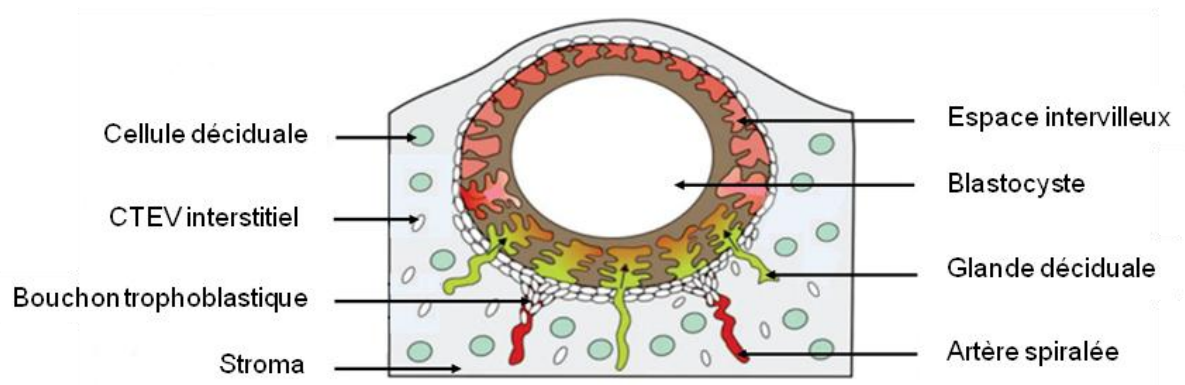


Figure 10 : Mise en place de la nutrition histiotrophe. Adapté de [58].

La nutrition histiotrophe se met en place chez l'Homme dès l'implantation de l'embryon dans l'endomètre et perdure jusqu'à la mise en place de la placentation hémochoriale, à la fin du premier trimestre de grossesse. Elle est caractérisée par la sécrétion de molécules nutritives (glycogène, protéines et lipides), par les glandes et les cellules stromales déciduales, dans l'espace intervillositaire [54,55]. Les nutriments sont ensuite absorbés par le ST par endocytose. L'accumulation des nutriments dans le cytoplasme des cellules déciduales est dépendante de la décidualisation et de l'action de la progestérone [55,59]. De plus, un défaut de la production de glycogène a été observé dans l'endomètre de femmes souffrant d'infertilité non expliquée, soulignant ainsi son importance dans la croissance fœtale [60].

Au cours de la décidualisation primaire, les cellules stromales de la *decidua basalis* acquièrent un phénotype proche de celui des cellules épithéliales. Parmi ces cellules, certaines deviennent sécrétrices et forment les glandes déciduales qui libèrent les molécules nutritives dans l'espace intervillositaire [58]. La libération du glycogène et des gouttelettes lipidiques par les cellules glandulaires déciduales se fait par sécrétion apocrine (**Figure 11**). Les molécules nutritives se forment et s'accumulent au pôle apical des cellules, induisant la fragmentation de la membrane plasmique et l'expulsion du produit de sécrétion [61]. Les organites, situés au pôle basal, permettent à la cellule de conserver ses capacités sécrétrices malgré la perte de son pôle apical. La sécrétion apocrine est également utilisée par les glandes mammaires pour sécréter les différentes molécules nutritives qui constituent le lait maternel.

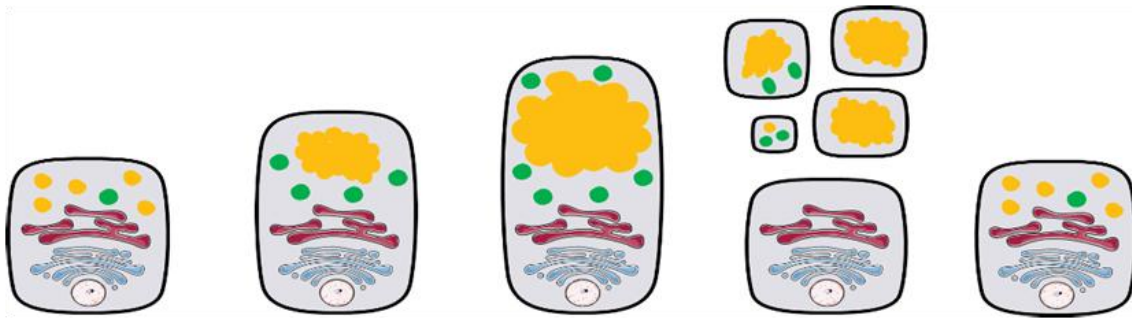


Figure 11 : Sécrétion apocrine par les cellules glandulaires.

3. Fonction sécrétrice

Les cellules de la *decidua basalis* (stromales et immunitaires) ont une fonction sécrétrice paracrine et endocrine importante. En effet, elles sécrètent de nombreuses molécules qui vont permettre de réguler les mécanismes de décidualisation, d'invasion trophoblastique et d'immunotolérance. D'un point de vue immunologique, la grossesse est un état inflammatoire modéré où le fœtus est considéré comme une greffe semi-allogénique. Ainsi, dans le microenvironnement de la *decidua basalis*, on retrouve un mélange d'hormones et de facteurs de croissance mais également de cytokines pro-/anti- inflammatoires. L'équilibre entre ces différents facteurs est parfaitement régulé durant une grossesse physiologique et toute perturbation dans cet équilibre peut causer des pathologies sévères [62].

- Prolactine

La prolactine est une protéine de 23 kDa codée par le gène *PRL* localisé sur le chromosome 6. Elle est l'hormone la plus abondamment produite par les cellules du stroma déciduel et représente ainsi un bon marqueur de décidualisation. Sa synthèse débute lors de la phase sécrétoire du cycle menstruel et augmente progressivement. Elle s'accumule ensuite dans le liquide amniotique et atteint un pic entre la 20^{ème} et la 25^{ème} semaine de grossesse, avant de décliner progressivement [63,64]. Il existe également une forme courte de la prolactine de 16 kDa issue d'un clivage de la forme longue par différentes enzymes dont la cathepsine D ou les MMP [63,65].

La synthèse de la prolactine dans la *decidua basalis* est induite principalement par la progestérone [63]. Chez l'Homme, le récepteur de la prolactine (PRL-R) existe sous deux formes différentes (isoforme courte et longue) [63,66]. Ces récepteurs sont exprimés au niveau de la *decidua basalis*, notamment au niveau de l'épithélium glandulaire [58]. Après la liaison à son récepteur, la prolactine induit l'activation de la voie JAK2-STAT2/5 (Janus Activated Kinase et Signal Transducer and Activator of Transcription) qui favorise le développement et la maturation des cellules sécrétrices déciduales [63,67]. La prolactine

participe également à l'implantation embryonnaire. Cet effet a été démontré dans un modèle de souris déficientes pour la prolactine qui sont stériles et dont l'utérus est complètement réfractaire à l'implantation [68]. Chez l'Homme, une faible production de prolactine, au niveau de la *decidua basalis*, a également été associée avec l'infertilité et la survenue de fausses-couches à répétition [69]. La prolactine améliore également la migration et l'invasion des trophoblastes en remaniant leur répertoire d'intégrines [70]. Enfin, elle a un effet modulateur sur l'angiogenèse, dépendant de sa forme. En effet, il a été montré que les formes longues (23 kDa) et courtes (16 kDa) ne se lient pas aux mêmes populations de récepteurs [71]. Ainsi, la forme longue exerce un effet pro-angiogénique alors que la forme courte est anti-angiogénique [72].

- Relaxine

La relaxine est une hormone peptidique de 6 kDa structurellement proche de l'insuline. Elle est essentiellement sécrétée par le corps jaune, la *decidua basalis* et le placenta. Elle est connue pour ses propriétés myorelaxantes et participe à l'adaptation des voies génitales à l'état de gestation et à l'inhibition des contractions du myomètre [73]. Elle induit également le relâchement du col de l'utérus au moment de l'accouchement.

En induisant la sécrétion de prolactine et de VEGF, la relaxine participe activement à la décidualisation et à l'angiogenèse au cours de la maturation endométriale [74]. Ce faisant, elle participe à la mise en place d'un microenvironnement favorisant le recrutement de cellules immunes au sein du stroma décidual [73,75]. Enfin, elle favorise le remodelage de la MEC en stimulant la production de différentes MMP (MMP-1, MMP-3 et MMP-9) et en inhibant la production de TIMP-1 [76-78].

- Interleukines (IL)

Les interleukines représentent une grande famille de cytokines qui sont sécrétées par les cellules immunitaires, stromales et trophoblastiques de la *decidua basalis* et qui ont des effets pléiotropes. Elles peuvent être pro-ou anti-inflammatoires et ont des effets variés lors de la grossesse [62]. Parmi les interleukines essentielles durant la grossesse, on trouve notamment l'IL-1 qui stimule la production d'hCG mais également d'IL-6, de TNF- α et de prostaglandines [79,80]. De plus, elle induit la production de MMP-1 par les cellules du stroma décidual, favorisant ainsi le remodelage de la MEC [81]. L'IL-6 augmente l'invasion trophoblastique en augmentant l'activité enzymatique des MMP-2 et MMP-9 [82]. L'IL-11 favorise la décidualisation en potentialisant l'effet de la progestérone et en limitant la sécrétion de TNF- α [83,84]. L'IL-15 augmente l'invasion en augmentant la production de MMP-1 [85,86]. En plus de cela, elle active les cellules NK de la *decidua basalis* (dNK) et

induit leur prolifération [87,88]. Enfin, l'IL-18 stimule la production d'IFN- γ par les cellules dNK [88-90].

D'une manière plus générale, les interleukines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-11, IL-15) stimulent l'invasion trophoblastique alors que les interleukines anti-inflammatoires (IL-4, IL-10, IL-13) l'inhibent.

- TNF- α

Le TNF- α est une cytokine pro-inflammatoire sécrétée par les cellules NK et les trophoblastes pour induire l'apoptose des cellules endothéliales des artères spiralées avant leur remplacement par les CTEV endovasculaires [37]. De manière contradictoire, il a également été montré que le TNF- α augmente l'expression de PAI-1 et limite ainsi l'invasion trophoblastique [91,92].

- TGF- β

Le TGF- β est une cytokine anti-inflammatoire qui exerce de nombreuses fonctions immunosuppressives. Il est sécrété en abondance dans la *decidua basalis*, principalement par les lymphocytes T régulateurs (LTreg), et permet la mise en place d'un microenvironnement immunosuppresseur et antiprolifératif [93,94]. De plus, il inhibe l'invasion trophoblastique en induisant l'expression des inhibiteurs de protéases TIMP-1 et TIMP-2 dans les CTEV [95]. En parallèle, il inhibe la sécrétion de protéases telles que MMP-9 et uPA (urokinase Plasminogen Activator) [96]. Enfin, il a été montré que la survenue de la pré-éclampsie est associée à des taux de TGF- β plus élevés dans le sang maternel [97].

G. Les Fonctions du placenta

Le placenta est un organe hautement spécialisé qui exerce de nombreuses fonctions durant la grossesse. Sa fonction principale est d'assurer les échanges avec la mère pour permettre un apport nutritif constant au fœtus. De plus, il agit comme une barrière physique et immunologique qui protège le fœtus des pathogènes qui infectent la mère. Enfin, il possède une fonction sécrétrice endocrine et synthétise différentes hormones nécessaire au maintien de la grossesse.

1. Fonction d'échange

Durant la grossesse, le fœtus doit assimiler des nutriments en provenance du compartiment maternel de manière continue et en quantité suffisante. Les mécanismes de transport des nutriments diffèrent en fonction de l'avancement de la grossesse. Au cours du premier

trimestre de grossesse, la *decidua basalis* assure la nutrition histiotrophe du fœtus et les ST absorbent les sécrétions glandulaires par endocytose. A partir du deuxième trimestre de grossesse, la placentation hémochoriale se met en place et une nutrition hémotrophe (par le sang) se met en place. Le sang maternel est alors séparé du sang fœtal par le ST, le CTV, les cellules mésenchymateuses, l'endothélium et la lame basale des capillaires fœtaux [98]. Avec l'avancement de la grossesse, le nombre de vaisseaux sanguins de la villosité chorale augmente et leur distance de la couche de ST diminue. Le ST entre alors en contact direct avec les vaisseaux sanguins fœtaux créant ainsi une zone privilégiée pour les échanges nutritifs. De plus, le ST exprime l'ensemble des systèmes de transport cellulaire nécessaires aux échanges avec la circulation maternelle.

- Diffusion passive

La diffusion passive ou diffusion simple correspond au mouvement de molécules hydrophobes ou de faible poids moléculaire selon un gradient électrochimique, de la mère vers le fœtus. Ainsi, elle permet le transport de l'oxygène (O_2), du dioxyde de carbone (CO_2), de l'urée mais également des acides gras non-estérifiés à travers le ST.

- Diffusion facilitée

La diffusion facilitée nécessite la présence de transporteurs spécifiques à la surface des ST. Ce système s'effectue selon le gradient électrochimique et ne nécessite donc aucun apport en énergie. Le transport de l'eau et des électrolytes (Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , Cl^-) est réalisé par des aquaporines et des canaux ioniques respectivement. Ce mécanisme intervient également dans le transport de glucose et de lipides à travers le placenta [99]. Le transport de glucose se fait par l'intermédiaire des transporteurs GLUT (Glucose Transporter). Au niveau du placenta, on retrouve de nombreuses isoformes des transporteurs GLUT (GLUT1, 3, 4, 8, 9, 10 et 12). Parmi ces isoformes, GLUT1 est la plus abondante et son niveau d'expression augmente progressivement avec l'avancement de la grossesse [100]. Le transport des acides gras à longue chaîne et du cholestérol se fait grâce à des transporteurs présents dans la membrane des ST tels que FAT (Fatty Acid Translocase), FATP (Fatty Acid Transporter Protein) et FABP (Fatty Acid Binding Protein) [101,102].

- Transport Actif

Le transport actif permet le passage de molécules, par des protéines de transport, contre le gradient électrochimique. Il est donc dépendant de l'hydrolyse d'ATP et nécessite l'activité enzymatique de pompes telles que la Na^+/K^+ ATPase ou la Ca^{2+} ATPase. Les molécules pourront alors traverser la membrane des ST en utilisant le gradient électrochimique fourni par les pompes ioniques. Ce type de transport est essentiel pour l'entrée des acides aminés

dans le placenta. Les acides aminés neutres, non cationiques et non essentiels utilisent des transporteurs sodium-dépendants sont appelés SNAT (Sodium-coupled Neutral Amino acid Transporter). Dans le placenta, on retrouve principalement les isoformes SNAT1, SNAT2 et SNAT4 [103]. Les acides aminés essentiels utilisent des transporteurs sodium-indépendants tels que LAT1 et LAT2 (L-type Amino acid Transporter) pour au placenta [104].

- Endocytose

L'endocytose est une voie utilisée principalement pendant la nutrition histiotrophe, mais qui persiste tout au long de la grossesse. Elle permet l'entrée d'immunoglobulines (Ig) maternelles dans le placenta et leur accès au compartiment fœtal [105]. Elle permet également l'entrée de fer, suite à la liaison de la transferrine à son récepteur qui déclenche son internalisation par des vésicules de clathrine [106].

2. Fonction protectrice

Le placenta est un organe qui protège le fœtus lors d'infections maternelles. Il constitue une barrière physique imperméable qui bloque la progression de la majorité des pathogènes (virus, bactéries, parasites, ...) et restreint leur accès au fœtus. De plus, il est clairement établi que le placenta n'est pas une barrière inerte et met en place diverses stratégies efficaces telles que la sécrétion d'interférons, d'exosomes et de miARN (micro Acide Ribonucléique).

a. Interférons (IFN)

Les interférons sont des cytokines antivirales sécrétées par les cellules lorsqu'elles détectent des motifs moléculaires caractéristiques de pathogènes *via* des récepteurs spécifiques de la famille des PRR (Pattern Recognition Receptor). Chez l'Homme, les interférons ont des effets pléiotropes et sont divisés en trois groupes : Les interférons de type I (IFN- α et IFN- β), de type II (IFN- γ) et de type III (IFN- λ). Lorsqu'ils sont sécrétés, les interférons vont agir de manière paracrine sur les cellules proches. En se fixant sur leurs récepteurs spécifiques, les interférons de type I et III vont induire la phosphorylation et l'activation des kinases JAK1/TYK2 (Janus Kinase 1 et Tyrosine Kinase 2) (**Figure 12**). Ces kinases vont alors activer STAT1 et STAT2 qui vont s'hétérodimériser et se lier à la protéine IRF9 (Interferon Regulatory Factor 9). Le complexe ainsi formé est ensuite transloqué au noyau, se fixe sur des régions promotrices ISRE (IFN-Stimulated Response Element) et induit la transcription de nombreux ISG (IFN-Stimulated Gene) [107,108]. Ces ISG vont exercer une fonction antivirale et ainsi limiter la propagation de l'infection.

De manière similaire aux interférons de type I et III, l'IFN- γ se fixe à son récepteur et induit l'activation de JAK1/JAK2 qui vont à leur tour activer STAT1 en le phosphorylant (**Figure 12**). STAT1 va alors former un homodimère qui sera transloqué au noyau. Il se fixera sur des régions promotrices GAS (Gamma-IFN Activated Sites) pour induire des ISG pro-inflammatoires [107,108].

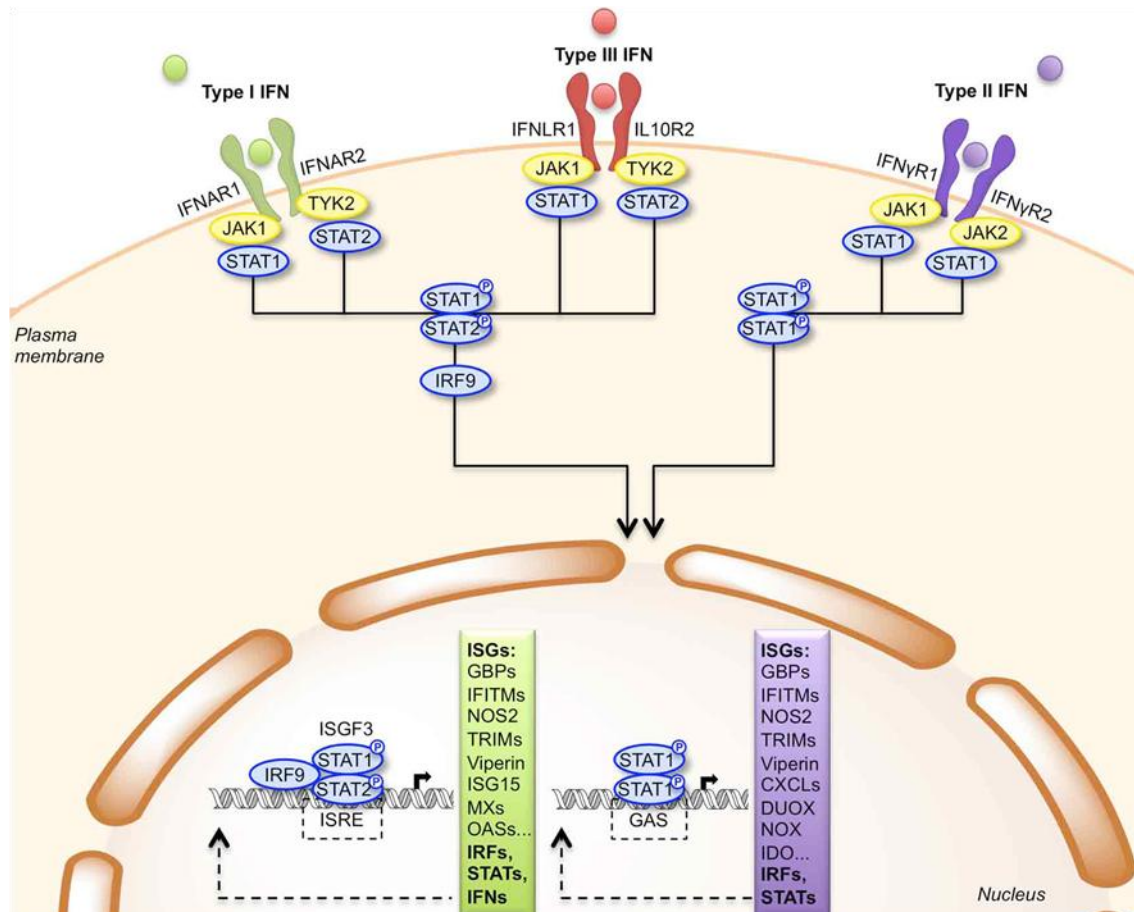


Figure 12 : Signalisation induite par les Interférons de type I, II et III. IRF9 : IFN-Regulatory Factor 9 ; ISG : IFN-Stimulated Gene ; ISRE : IFN-Stimulated Response Element ; GAS : Gamma-IFN Activated Site ; JAK : Janus Activated Kinase ; TYK2 : Tyrosine Kinase 2 ; STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription. [107].

Durant la grossesse, les interférons de type I participent à limiter les infections virales. Ce rôle a été mis en évidence dans un modèle de souris déficientes pour le récepteur des IFN- α/β (IFNAR $^{-/-}$). Il a été montré que, comparées aux souris contrôles, les souris IFNAR $^{-/-}$ infectées par un virus d'Herpès murin développaient une pathologie plus sévère avec une augmentation de la charge virale et de l'état inflammatoire [109,110]. Cette aggravation de la pathologie est associée à une transmission du virus au fœtus et à une létalité plus forte. De manière intéressante, les souris IFNAR $^{-/-}$ ayant un fœtus IFNAR $^{+/+}$ sont protégées contre l'exacerbation de l'infection, ce qui confirme l'importance de l'IFN placentaire dans le

contrôle de l'infection. De plus, il a également été montré que l'IFN- ϵ , un nouveau membre de la famille des IFN de type I, est exprimé de manière constitutive dans le TRF et participe au contrôle d'infections bactériennes et virales [111]. Enfin, malgré leur contrôle efficace des infections, les interférons de type I peuvent avoir des conséquences délétères sur la croissance fœtale. Ce phénomène a été mis en évidence dans un modèle de souris IFNAR^{-/-} infectées par le virus Zika (ZIKV) [112]. Ainsi, il a été montré que les souris IFNAR^{+/-} sont protégées contre l'infection mais que cette protection est associée à des anomalies du développement placentaire et à des retards de croissance.

Il n'existe que peu de données concernant le rôle de l'IFN- λ durant la grossesse. Il a cependant été montré qu'il pouvait être produit par les ST et que cette sécrétion participe à limiter l'infection par le ZIKV [113].

b. Exosomes et miARN

Les exosomes sont des microvésicules de 30 à 90 nm libérées par les cellules dans leur microenvironnement et qui permettent le transfert d'acides nucléiques, de protéines, de lipides. Les trophoblastes placentaires sécrètent de grandes quantités d'exosomes qui sont enrichis en miARN, [114]. Les miARN sont une famille de petits ARN non codants de 20 à 25 nucléotides qui agissent en tant que répresseurs post-transcriptionnels des ARN messagers [115]. De plus, chaque miARN peut cibler plusieurs centaines de gènes [116]. Ces miARN jouent un rôle clé dans la communication cellulaire et la régulation génique paracrine.

Les C19MC (Chromosome 19 miRNA Cluster) sont une famille de miARN spécifique des primates, qui sont fortement exprimés dans le placenta et dans le sang des femmes enceintes [117,118]. De manière intéressante, il a été montré que les exosomes dérivés de ST permettent de transférer une résistance virale à de nouvelles cellules [119]. En étudiant les mécanismes qui sous-tendent ce contrôle, les auteurs ont prouvé que les C19MC participent au transfert de la résistance. De plus, ils ont montré que l'expression isolée de différents miARN de cette famille (miR517-3p, miR516b-5p et miR512-3p) suffisait à limiter la réplication virale. En analysant plus en détail les mécanismes associés au contrôle viral, les auteurs ont découvert que les exosomes dérivés des ST induisent une augmentation de l'autophagie, qui est dépendante des miARN C19MC et nécessaire à l'inhibition virale.

L'autophagie est un processus qui consiste en l'autolyse des cellules et qui est caractérisée par la mise en place de vésicules à deux membranes issues de la fusion de lysosomes nommées autophagosomes [120]. Ces vésicules permettent la dégradation d'organelles, d'agrégats protéiques et protéines ubiquitinylées. En conditions basales, les cellules ne font que peu d'autophagie. Elle peut cependant être induite par différents stimulus ou stress tels que le manque de nutriments, le stress oxydatif, le stress du réticulum, l'hypoxie et l'infection

par un pathogène [120-122]. L'autophagie participe directement aux mécanismes de défense cellulaire en dégradant les virus cytoplasmiques dans les autophagosomes [123,124]. De plus, elle limite la réplication virale et promeut la survie cellulaire [125,126]. Enfin, elle est requise pour l'activation de la signalisation induite en réponse aux interférons et limite les signaux inflammatoires en réponse aux infections [127,128].

3. Fonction sécrétrice

Les hormones placentaires sont essentielles au maintien de la grossesse. Elles sont majoritairement produites par le ST et agissent de manière autocrine, paracrine et endocrine.

- Hormone Chorionique Gonadotrope (hCG)

L'hCG est une hormone polypeptidique majoritairement produite par le ST. Elle présente une forte homologie structurale avec la LH et partage le même récepteur. Elle possède cependant une affinité supérieure, comparée à la LH, pour ce récepteur [129,130]. Elle exerce un effet endocrine sur l'ovaire qui permet le maintien du corps jaune mais également un effet autocrine sur le ST qui favorise la différenciation des CT sous-jacents [131]. Elle agit de manière paracrine dans l'utérus et favorise l'implantation embryonnaire en inhibant l'expression de TIMP-1 et en stimulant l'activité de MMP-2, contribuant ainsi à la réorganisation de la MEC [132]. De plus, elle stimule l'invasion trophoblastique en augmentant l'activité des MMP-2 et MMP-9 dans les CTEV [133]. Elle agit également sur l'immunotolérance déciduale en augmentant le nombre de LT régulateurs et en augmentant la production d'IL-10 et d'IDO (Indoleamine 2,3-Dioxygénase) par les cellules dendritiques (DC), les rendant ainsi tolérogènes [94,134]. Enfin, elle stimule l'angiogenèse en activant la production de VEGF par les cellules déciduales, et diminue la résistance des artères spiralées maternelles [135,136].

- Hormone Lactogène Placentaire (hLP)

L'hLP est produite principalement par le ST et représente l'hormone la plus abondamment produite par le placenta. Au cours de la grossesse, elle exerce un effet pro-sécrétoire et prolifératif dans les cellules endométriales [58]. Elle semble également jouer un rôle important dans la régulation de la croissance fœtale. En effet, il existe une corrélation positive entre les taux sériques d'hLP maternels et le poids fœtal. En accord avec cela, de faibles concentrations d'hLP ont été associées à la survenue du retard de croissance *in utero* [137]. De plus, l'injection chronique d'hLP chez la ratte gestante a pour conséquence d'augmenter le poids des rats à la naissance [138]. Ces effets sont associés à une augmentation de la production des facteurs de croissance tels qu'IGF-1 et IGF-2 [139].

- Progestérone

La progestérone, sécrétée initialement par le corps jaune, induit la décidualisation de l'endomètre. A partir de la 10^{ème} semaine de grossesse, le ST acquiert le système enzymatique lui permettant de convertir le cholestérol maternel en progestérone. Durant la grossesse, cette progestérone participe au maintien de la gestation en assurant le maintien et l'intégrité de l'endomètre. Elle a une fonction anti-invasive au niveau de la *decidua basalis* en inhibant la production de nombreuses MMP et en induisant celle des inhibiteurs PAI-1 et TIMP-3 [140,141]. De plus, elle régule négativement la contractilité du myomètre, augmentant ainsi la quiescence utérine et prévenant le déclenchement prématuré de l'accouchement [142,143]. Enfin, elle participe aux mécanismes d'immunotolérance en diminuant les fonctions effectrices des LT maternels [144]. Elle induit également une modification du microenvironnement local en augmentant la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (IL-4) et en inhibant celle de cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ et TNF- α).

- Oestrogènes

De manière identique à la progestérone, le placenta prend progressivement le relais du corps jaune et synthétise des doses d'oestrogènes croissantes jusqu'à l'accouchement. En plus de leurs nombreux rôles durant la phase proliférative du cycle menstruel, les oestrogènes participent au développement placentaire en stimulant la différenciation des trophoblastes. Ils sont également impliqués dans le déclenchement de l'accouchement augmentant l'expression des protéines impliquées dans la contraction du myomètre (ocytocine et prostaglandines).

H. Les modèles animaux de placentation

Il n'existe pas de modèle animal qui reproduise de manière fidèle les différentes étapes de placentation et d'établissement de la grossesse humaine. Chez le singe Rhésus, même si elle reste importante, l'invasion trophoblastique est beaucoup moins profonde que chez l'Homme et n'atteint pas le myomètre [145]. Le remodelage du réseau vasculaire utérin est également moins marqué.

Chez les rongeurs, la placentation est également hémochoriale mais présente des différences marquées qui limitent la transposition des observations murines à l'Homme. Pour rappel, chez l'Homme, la décidualisation se déclenche à la phase sécrétoire de chaque cycle menstruel et se caractérise par une modification de l'ensemble de la muqueuse utérine (*decidua basalis*, *parietalis* et *capsularis*). Au contraire, chez la souris, la décidua n'est formée qu'après l'implantation de l'embryon dans l'utérus, et uniquement niveau du site

d'implantation. De même, l'invasion trophoblastique est bien moins profonde chez la souris et ne nécessite pas, contrairement à l'Homme, l'aide des cellules dNK. La localisation même de ces cellules diffère, les cellules dNK murines infiltrant directement les artères maternelles et participant à la destruction des parois vasculaires et au remodelage du réseau sanguin, indépendamment de la présence de CTEV endovasculaires [146]. La fonction des cellules dNK chez la souris est toujours peu connue. De plus, elles ne sont présentes en nombre important qu'entre les jours 8 à 10 de gestation. Leur nombre décroît alors rapidement et elles disparaissent quasiment de la *decidua basalis*, pour aller se localiser dans le triangle mésométrial, formé par les deux membranes du myomètre, à distance des cellules fœtales [1]. Enfin, bien que des problèmes puissent être observés chez la souris, notamment au niveau du nombre de fœtus ou de la taille des embryons, les souris déficientes en cellules NK sont fertiles. Des différences majeures sont cependant observées au niveau du réseau vasculaire utérin, qui garde son aspect non-remodelé comme en conditions non gestantes [147,148].

En conclusion, chaque espèce ayant une placentation qui lui est propre, le meilleur moyen d'étudier la placentation humaine la culture reste encore l'utilisation *ex vivo* de tissus et de cellules ou la xénogreffe. Ainsi, le groupe de Susan Fisher a développé un nouveau modèle de « placentation humaine *in vivo* » en greffant des villosités chorales sous la capsule rénale de souris immunodéprimées SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency) [149]. Ces villosités vont alors se développer et envahir le parenchyme rénal, mimant ainsi l'invasion trophoblastique.

I. Les pathologies de la grossesse

1. Pathologies non infectieuses

a. Pré-éclampsie

La pré-éclampsie est une pathologie de la grossesse qui affecte la mère après la 20^{ème} semaine de grossesse et se caractérise par une hypertension associée à une protéinurie (>300 mg/jour). Elle touche entre 3 et 5% des femmes enceintes [150]. Si elle n'est pas traitée à temps, la pré-éclampsie évolue vers l'éclampsie qui se caractérise par une apnée, des contractions musculaires et des convulsions. Cette évolution s'accompagnera également de crises cardiaques, d'insuffisances hépatiques et rénales ainsi que d'œdèmes pulmonaires. Ainsi, la pré-éclampsie représente une des causes principales de mortalité chez la femme enceinte.

La pré-éclampsie est associée à un défaut d'invasion trophoblastique et de remodelage des artères spiralées et se caractérise notamment par l'absence de bouchons trophoblastiques (**Figure 13**). Le placenta doit alors se développer en normoxie durant le premier trimestre de grossesse, ce qui aura des conséquences délétères (placenta de petite taille et défaut de vascularisation). A partir du deuxième trimestre, le défaut d'invasion trophoblastique empêche le remodelage vasculaire et l'afflux sanguin dans l'espace intervilloux devient insuffisant, causant alors une ischémie placentaire et un stress oxydatif [151]. Cette ischémie est responsable de retards de croissance *in utero* alors que le stress oxydatif induit la production de radicaux libres et de cytokines qui déclenchent l'apoptose des ST. Cette apoptose va entraîner une libération de corps apoptotiques dans la circulation maternelle, qui causeront une inflammation de l'endothélium maternel et une hypertension. La dysfonction endothéliale sera à l'origine de l'ensemble des complications cliniques hépatiques, cardiaques et rénales.

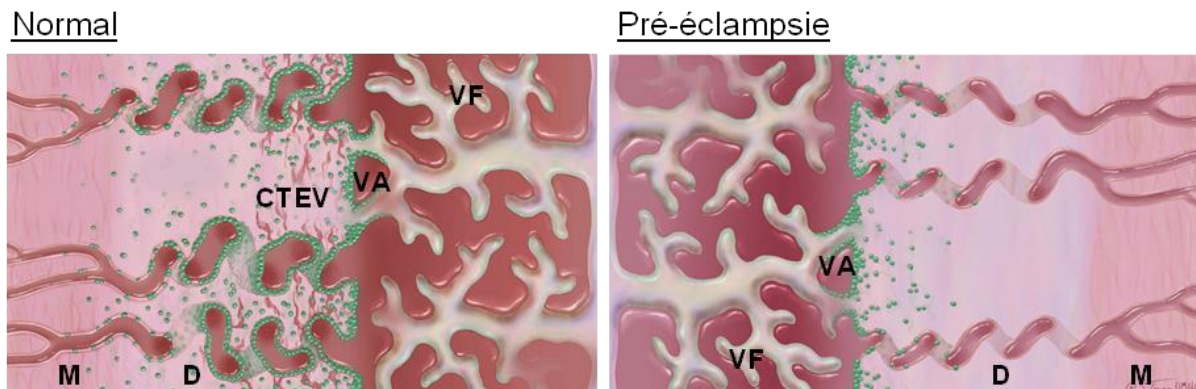


Figure 13 : Pathogenèse de la pré-éclampsie. M : Myomètre ; D : Décidua ; CTEV : Cytotrophoblaste Extravilloux ; VA : Villosité Ancrée ; VF : Villosité Flottante. Adapté de [152].

b. Retard de croissance in utero (RCIU)

Le RCIU est une pathologie de la grossesse qui affecte 10% des fœtus et qui se caractérise par une réduction voire un arrêt total de la croissance fœtale [153]. Le fœtus a alors une taille et un poids insuffisants, ce qui peut avoir des conséquences graves à court terme (hypertensions, anomalies comportementales, dérégulations de la glycémie) mais aussi à long terme (autisme, retards mentaux, troubles moteurs). De plus, le RCIU prédispose à un grand nombre de pathologies à l'âge adulte telles que le diabète, l'obésité, les maladies neurodégénératives, la dépression, la schizophrénie, ... [153].

La pathogenèse du RCIU est liée à des altérations de la fonction d'échange du placenta et une diminution des échanges nutritionnels entre la mère et le fœtus. Les fœtus présentant

un RCIU ont alors un placenta de petite taille qui présente également des défauts de vascularisation. Ces anomalies de la structure placentaire sont également associées à une apoptose excessive et à un défaut d'invasion trophoblastique [154,155].

c. Placenta accreta

Le placenta accreta est une pathologie de la grossesse résultant d'une invasion trophoblastique excessive qui cause une adhésion anormale du placenta dans le myomètre. Il existe différents stades de cette pathologie, correspondant à différents niveaux de sévérité (**Figure 14**). Le placenta *accreta* (81% des cas) se définit par une adhésion anormale du trophoblaste au myomètre. Le placenta *increta* (12% des cas) correspond à une invasion du myomètre par le placenta. Enfin, le placenta *percreta* (7% des cas) se caractérise par une invasion totale du myomètre et du périmètre. Cette pathologie est associée à de forts risques d'hémorragies lors de l'accouchement et a un taux de mortalité élevé, estimé à 7% dans la population mondiale [156].

La pathogenèse du placenta *accreta* résulte d'un défaut de décidualisation associée à une invasion trophoblastique excessive [156]. Ainsi, une augmentation de la production de facteurs pro-invasifs et pro-angiogéniques par a notamment été observée [157]. En parallèle, il a été montré que si la décidua est altérée, elle perd sa capacité à limiter l'invasion trophoblastique ; ce qui pourrait participer à l'exacerbation de la pathologie [156,158].

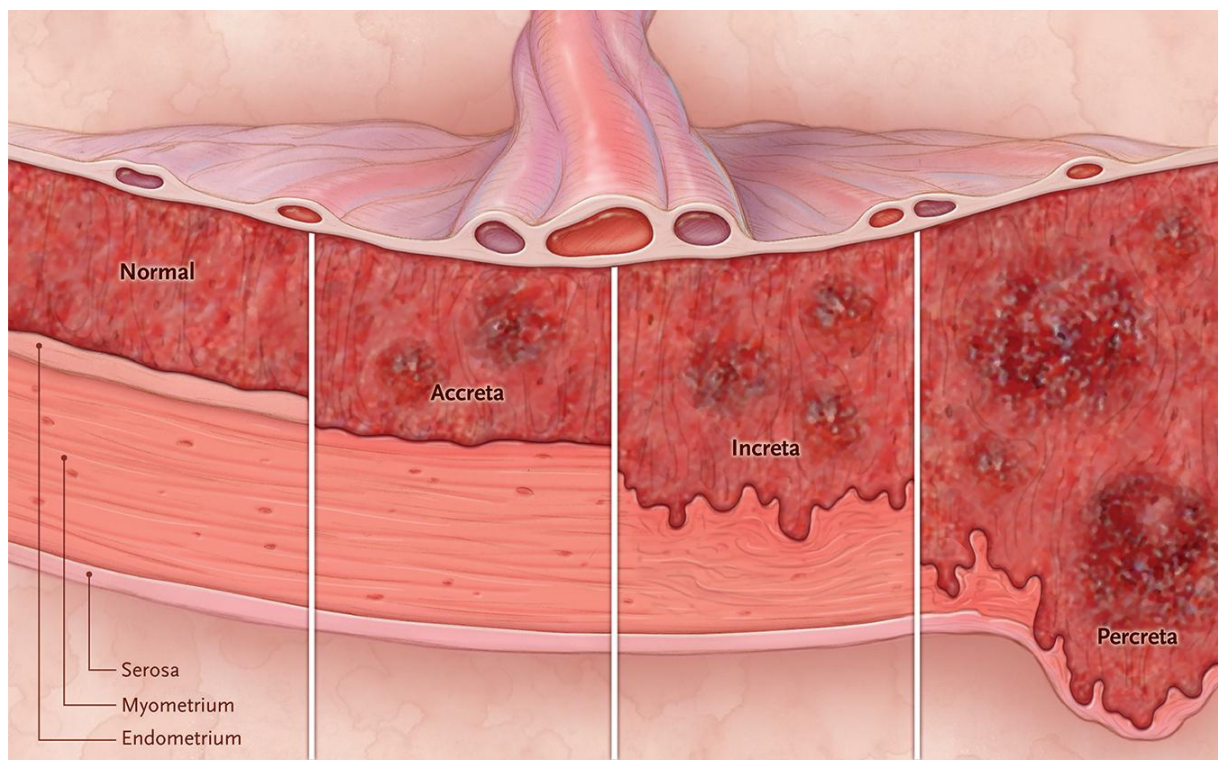


Figure 14 : Pathogenèse du placenta accreta et stades de la pathologie. Source : https://resident360.nejm.org/content_items/placenta-accreta-spectrum.

2. Pathologies infectieuses

Les infections congénitales sont des infections qui résultent de la transmission *in utero* ou néonatale d'agents pathogènes (virus, bactérie ou parasite), de la femme enceinte au fœtus, et qui persistent après la naissance de ce dernier. Certaines infections congénitales ont des conséquences graves sur le développement fœtal ou sur la santé de l'enfant après sa naissance [159]. Le terme TORCH (Toxoplasmosis, Others, Rubella, Cytomegalovirus et Herpes) désigne la principale famille de pathogènes responsables d'infections congénitales associées à des pathologies fœtales sévères.

a. Toxoplasmose

Toxoplasma gondii est un parasite protozoaire intracellulaire qui a pour hôte principal les félins et qui se transmet par l'ingestion de viande contaminée peu cuite. Sa transmission au fœtus résulte généralement d'une primo-infection de la mère durant la grossesse, la mère n'ayant pas développé d'immunité protectrice contre le parasite. Le taux de transmission varie selon l'avancement de la grossesse, allant de 6% au premier trimestre à 72% au troisième trimestre [160]. Cependant, les formes les plus sévères de la pathologie sont observées lorsque l'infection a lieu de manière précoce. La transmission de *Toxoplasma gondii* peut alors causer des avortements, la mort fœtale et calcifications intracrâniennes responsables de déficits neurocognitifs et de chorioretinites [161].

b. Others

Le groupe O pour « Others » regroupe différents virus qui peuvent se transmettre au fœtus et causer des infections congénitales. Ainsi, dans ce groupe, on retrouve différents pathogènes tels que le virus varicelle-zona (VZV), le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), le virus de l'Hépatite C (VHC), le parvovirus B19, le virus Coxsackie, la bactérie *Chlamydia trachomatis* et la bactérie *Treponema pallidum* (responsable de la syphilis).

Durant ma thèse, nous nous sommes intéressés à deux virus appartenant à ce groupe qui causent des pathologies graves durant la grossesse : le virus de l'Hépatite E (VHE) et le virus Zika (ZIKV). Ces virus seront décrits en détail dans la partie III de l'Introduction.

c. Rubéole

La rubéole est un virus à ARN simple brin de polarité positive enveloppé de la famille des *Togaviridae*. L'infection par ce virus est généralement bénigne chez l'enfant, mais peut entraîner des complications plus sévères chez l'adulte. Chez la femme enceinte, une primo-infection durant les 12 premières semaines de la grossesse aboutit, dans 80% des cas, à une transmission trans-placentaire et une infection persistante du fœtus [162]. L'infection *in*

utero causera diverses complications telles que la surdité, des retards mentaux, des défauts cardiaques ainsi que des dommages hépatiques. De plus, dans 20% des cas, la transmission au fœtus entraîne une fausse couche.

d. Cytomégalovirus humain (HCMV)

Le Cytomégalo

Lorsqu'il se transmet durant la grossesse, le HCMV est responsable de pathologies placentaires et développementales sévères. Au niveau de l'interface materno-fœtale, le HCMV se réplique dans les cellules stromales et endothéliales de la *decidua basalis* mais également dans les CTV et les cellules musculaires lisses des villosités [165]. De plus, l'infection est associée à une forte augmentation d'œdèmes, de villosités avasculaires et à une forte inflammation. L'infection altère également les capacités de migration et d'invasion du CTEV [166]. Ce défaut d'invasion du CTEV est à son tour responsable d'un mauvais remodelage vasculaire, qui réduit l'afflux sanguin maternel. L'accès aux nutriments du fœtus est alors réduit, ce qui peut provoquer un retard de croissance *in utero* et une naissance prématurée. Enfin, dans 15 % des cas, la primo-infection maternelle par le HCMV conduit à un avortement spontané précoce.

Sur le plan développemental, dans 5 à 10% des cas, l'infection congénitale par le HCMV cause des défauts irréversibles touchant le système nerveux central. Il est alors responsable de surdités, de microcéphalies, d'encéphalites, de retards psychomoteurs, et plus rarement de myopathies et de chorioretinites. De plus, le suivi post-natal a montré qu'environ 15% des enfants nés asymptomatiques finissent par développer des séquelles irréversibles tardives telles que des défauts auditifs ou neuro-développementaux [167]. Le fait que le HCMV infecte les progéniteurs neuraux et inhibe leur différenciation explique en partie la survenue des telles séquelles [168].

Le virus peut également être transmis au moment de la naissance, mais l'infection périnatale est généralement asymptomatique. L'infection congénitale par le HCMV reste une

problématique majeure car aucun traitement ne peut être administré à la femme enceinte sans avoir des effets néfastes sur développement fœtal [169].

e. *Herpès*

Les virus de l'herpès simplex 1 et 2 (HSV-1 et HSV-2) sont des *Herpesviridae* de la sous-famille des *Alphaherpesvirinae*. La transmission verticale de ces virus est relativement faible (environ 5%). Cependant, lors d'un accouchement vaginal, le risque de transmission au fœtus est de 80% si la mère a une infection génitale active par un HSV [170]. L'infection néonatale par le HSV peut alors causer : (a) des lésions de la peau, des yeux et de la bouche, (b) une encéphalite qui peut provoquer des morbidités neurologiques et (c) une pathologie disséminée qui touche de nombreux organes (cerveau, poumon, foie, cœur, peau, ...) et qui sans traitement adéquat est létale dans 80% des cas. La meilleure mesure préventive pour prévenir l'infection néonatale est de tester la mère pour le HSV. Si elle a une infection active au moment de la naissance, un accouchement par césarienne sera pratiqué, limitant alors l'infection néonatale [170].

II. Le Système Immunitaire

A. Présentation générale

L'immunité regroupe un ensemble de mécanismes de défense qui permettent de protéger l'organisme contre les menaces extérieures. Parmi ces mécanismes, on trouve notamment de nombreuses barrières qui bloquent l'entrée des pathogènes dans l'organisme et qui peuvent être physiques (peau et muqueuses) ou chimiques (pH du tractus digestif, enzymes dans la salive et autres sécrétions). Si un pathogène arrive à franchir ces barrières, l'organisme met en place une immunité active pour l'éliminer : le système immunitaire (SI). Chez l'Homme, le SI est composé d'un ensemble complexe de cellules, de tissus, d'organes lymphoïdes, de facteurs humoraux et de cytokines qui ont évolué en parallèle à notre environnement afin de permettre une défense efficace contre les menaces potentielles. Une des caractéristiques principales du SI est sa capacité à distinguer les molécules du « soi » qui constituent l'organisme, les molécules du « non-soi » telles que les pathogènes, et les molécules du « soi modifié » qui sont altérées ou transformées. Il joue également un rôle majeur dans la réparation tissulaire, le maintien de l'homéostasie et la cohabitation avec les micro-organismes bénéfiques du microbiote.

Le système immunitaire peut être divisé en deux composantes : l'immunité « innée » et l'immunité « adaptative » (**Figure 15**). Cette classification est justifiée par la rapidité, la spécificité, la durée et les fonctions effectrices impliquées dans la mise en place de la réponse immunitaire. Cependant, cette dichotomie entre immunité innée et adaptative tend à s'amenuiser progressivement car de plus en plus d'études parlent de cellules immunes innées avec des fonctions adaptatives et *vice-versa* [171,172]. De plus, certaines cellules immunes (cellules NKT et $LT\gamma\delta$) se trouvent à l'interface entre immunité innée et adaptative.

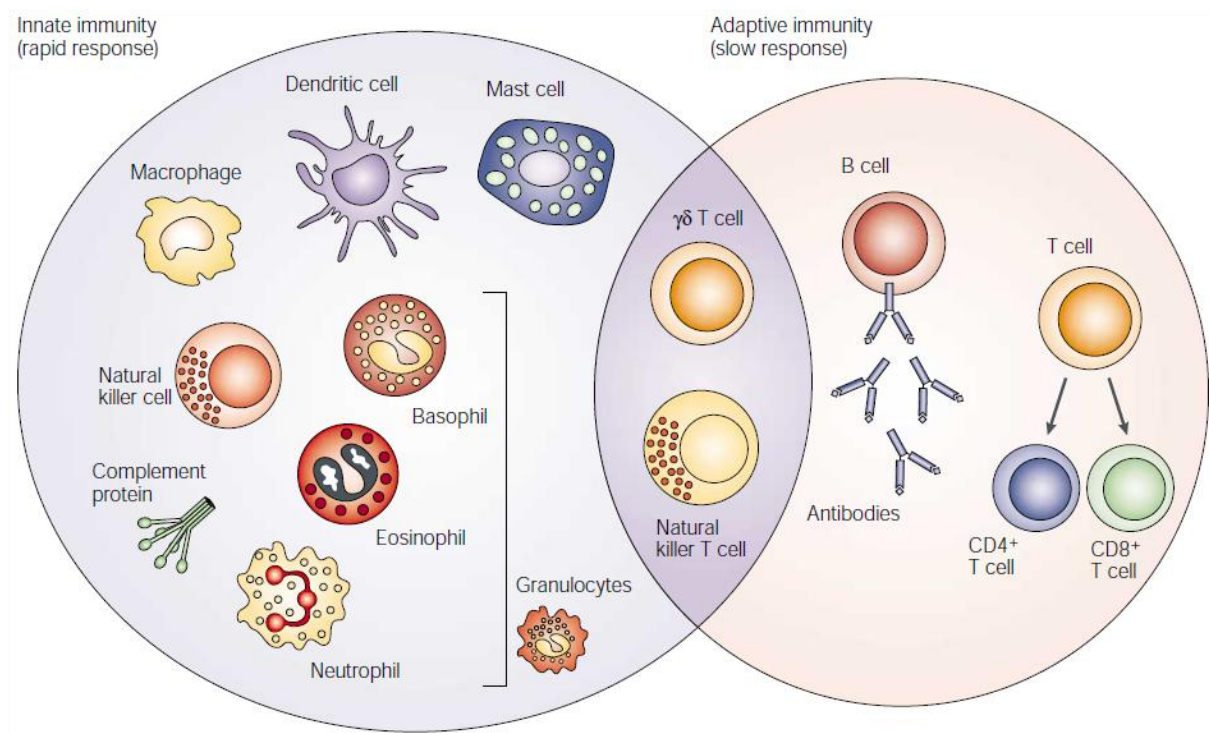


Figure 15 : Les cellules de l'immunité innée et adaptative. [173].

1. Immunité innée

Le système immunitaire inné est constitué de cellules qui s'activent de manière non spécifiques en reconnaissant des motifs moléculaires conservés entre les pathogènes ou des signaux de danger [174]. Parmi les nombreux acteurs cellulaires de cette réponse, on retrouve les neutrophiles, les monocytes, les cellules dendritiques, les basophiles, les éosinophiles et les cellules NK mais également des cellules résidentes des tissus comme les macrophages ou les mastocytes. Plus récemment, de nouvelles populations lymphoïdes innées (ILC) ont été caractérisées et divisées en trois sous catégories (ILC1, ILC2 et ILC3) [175]. Ainsi, l'immunité innée constitue une première ligne de défense efficace et généralement suffisante pour éliminer la majorité des pathogènes. Si la menace persiste, l'immunité adaptative se met en place.

2. Immunité adaptative

Contrairement à l'immunité innée immédiate, le système immunitaire adaptatif nécessite un délai avant son activation mais permet une réponse spécifique contre l'antigène rencontré. De plus, cette réponse s'accompagne de la mise en place d'une mémoire immunitaire qui permettra une réponse plus efficace lors d'une infection future par le même pathogène. La réponse adaptative est composée d'une réponse cellulaire par l'action des lymphocytes T (LT) et d'une réponse humorale basée sur les immunoglobulines produites par les

lymphocytes B (LB) [176]. La mise en place de l'immunité adaptative est dépendante de l'immunité innée et notamment des cellules dendritiques (DC), des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) professionnelles. Les cellules dendritiques sont capables de phagocyter les pathogènes et de migrer vers les organes lymphoïdes pour activer les LT et les LB.

Dans cette partie, nous détaillerons principalement le phénotype et les fonctions des cellules NK mais aussi des macrophages et des LT CD8. De plus, une attention particulière sera portée concernant le rôle de ces cellules durant la grossesse humaine.

B. Les cellules Natural Killer (NK)

Les cellules « naturelles tueuses » (ou NK) ont été caractérisées en 1975 par Rolf Kiessling comme étant des cellules lymphoïdes granuleuses capables de lyser des cellules tumorales sans stimulation spécifique par un antigène [177,178]. Elles représentent 5 à 20% des lymphocytes du sang périphérique et sont phénotypiquement définies par leur expression de la molécule CD56 ou NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule) et leur absence d'expression du CD3 [179,180]. Les cellules NK du sang périphériques (pNK) ont un turnover d'environ deux semaines [181]. Elles sont également présentes dans les organes lymphoïdes (rate, ganglions lymphatiques, ...) mais aussi dans des tissus tels que le foie, le pancréas, le cerveau et l'utérus gestant [181,182]. Deux sous-populations de cellules NK matures sont définies chez l'Homme en fonction de leurs localisations, leurs phénotypes et leurs fonctions (**Figure 16**). Ainsi, en se basant sur l'expression de CD56, on distingue classiquement les cellules NK CD56^{bright} (expression forte) et CD56^{dim} (expression intermédiaire).

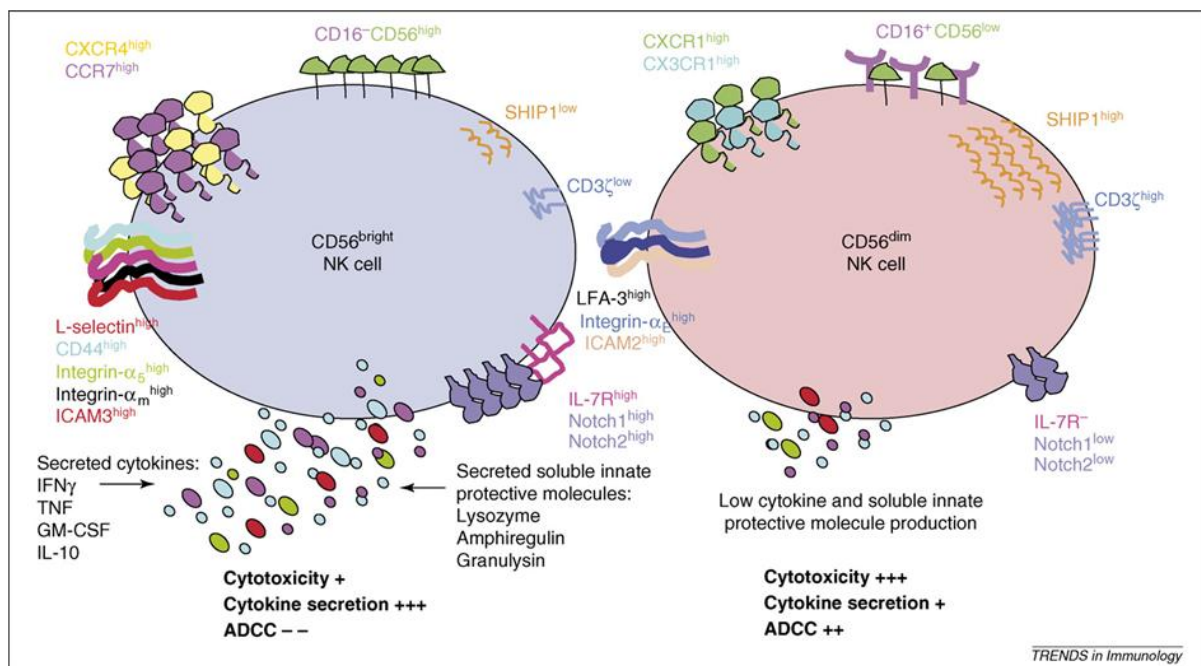


Figure 16 : Caractéristiques des cellules NK CD56^{bright} et CD56^{dim}. [183].

Les cellules NK CD56^{bright} représentent seulement 10% des cellules pNK mais sont majoritaires dans les tissus. Elles sont peu cytotoxiques et exercent une activité immunomodulatrice, majoritairement pro-inflammatoire, en sécrétant de cytokines (IFN- γ , TNF- α , GM-CSF et IL-10) après stimulation par l'IL-12 et l'IL-15 [184,185]. Le fait que les cellules NK CD56^{bright} expriment la L-sélectine (CD62L) et le récepteur aux chimiokines CCR7 pourrait expliquer leur localisation majoritairement tissulaire.

Les cellules NK CD56^{dim} représentent 90% des cellules pNK et sont minoritaires dans les tissus. Elles expriment fortement des molécules associées à la cytotoxicité telles que la perforine et les granzymes mais également le récepteur de faible affinité du fragment Fc des IgG (Fc γ RIII) ou CD16, qui est impliqué dans la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps ou ADCC (Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity). Les cellules NK CD56^{dim} exercent leur fonction cytotoxique en lysant les cellules cibles et en sécrétant de l'IFN- γ . De plus, elles expriment les récepteurs aux chimiokines CXCR1 et CX3CR1 qui permettent leur recrutement au niveau des sites inflammatoires [186,187].

1. Développement des cellules NK

De manière similaire aux LB et aux cellules myéloïdes, les premières étapes du développement des cellules NK se déroulent dans la moelle osseuse [188]. Les cellules NK se développent en plusieurs étapes, identifiables par l'expression de récepteurs membranaires, de facteurs de transcription et de cytokines. Bien que n'exprimant pas des récepteurs variables à leur surface, les cellules NK nécessitent également une phase « d'éducation » qui sélectionne les cellules NK utiles et rend anergique celles potentiellement dangereuses pour l'organisme. Enfin, elles peuvent se développer dans d'autres organes en périphérie dont la rate, le foie et le thymus [189].

a. Etapes du développement des cellules NK

La différenciation des cellules NK est un phénomène qui se produit dans la moelle osseuse, avant leur migration en périphérie pour se spécialiser et acquérir leurs fonctions effectrices. Cela a été démontré par des études chez la souris, où une altération de la moelle osseuse cause un défaut majeur dans le compartiment NK [190,191]. Il est cependant possible de différencier des cellules NK *in vitro* à partir de précurseurs CD34⁺, ce qui prouve que la moelle osseuse n'est pas un site de production exclusif [192]. Le développement des cellules NK à partir de progéniteurs nécessite la combinaison de différentes cytokines produites localement, notamment l'IL-15, et deux facteurs solubles sécrétés par les cellules stromales de la moelle osseuse, les ligands de c-Kit (KL) et de Flt-3 (FL) [193,194].

Le développement des cellules NK passe par quatre stades, définis sur la base de l'expression de marqueurs membranaires (**Figure 17**). Les progéniteurs NK (pro-NK) ont un phénotype $CD34^+CD117^+CD94^-$ et sont retrouvés dans la moelle osseuse et les organes lymphoïdes secondaires [188]. Ces pro-NK sont phénotypiquement proches du progéniteur lymphoïde commun (CLP) [195]. Sous l'effet des KL et FL, ces progéniteurs se différencient en précurseurs NK (pré-NK) qui sont $CD34^+CD117^+CD94^-$ et deviennent dépendants de l'IL-15 pour poursuivre leur développement [194]. Cependant, ces cellules ne sont pas encore totalement engagées dans le lignage NK et peuvent toujours devenir des LT ou des DC.

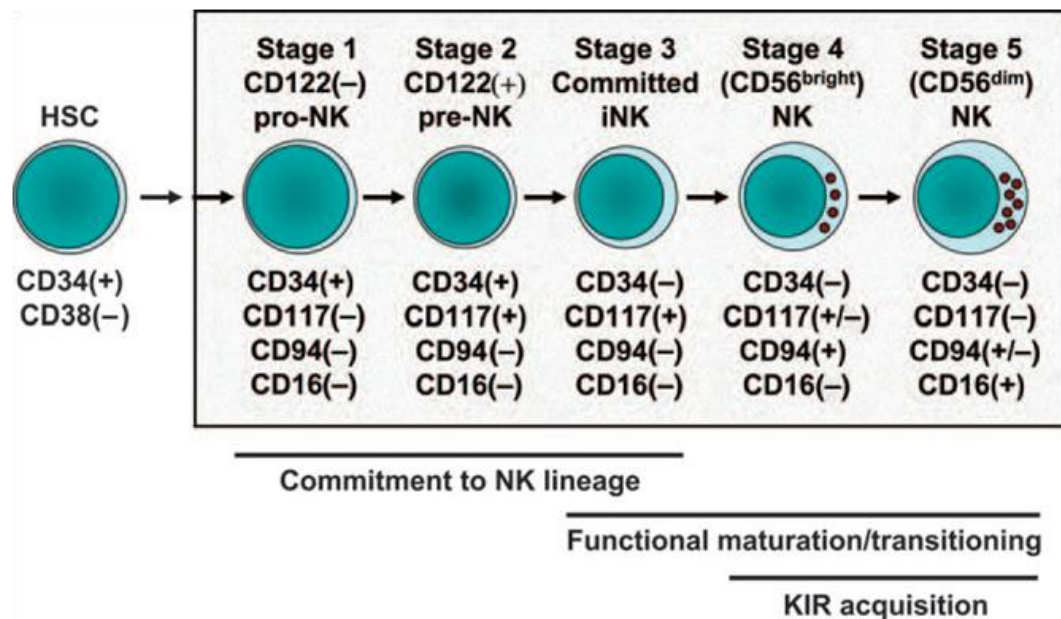


Figure 17 : Développement des cellules NK. [188].

Les pré-NK se différencient ensuite en cellules NK immatures (iNK) qui perdent leur potentiel multi-lymphoïde et expriment des marqueurs de cellules NK tels que le récepteur NKp44, le co-récepteur CD2 et la chaîne α du récepteur à l'IL-7 (CD127). L'expression de la molécule CD56, qui définit les cellules NK chez l'Homme, augmente également durant cette étape de différenciation. De plus, même si les cellules iNK ne produisent pas encore de molécules effectrices telles que l'IFN- γ et la perforine, elles peuvent quand même exercer une activité lytique par l'intermédiaire de TRAIL, un ligand de récepteurs à domaine de mort [196].

La dernière étape du développement des cellules est notamment marquée par l'acquisition du récepteur inhibiteur CD94/NKG2A, des récepteurs activateurs NKp46 et NKG2D ainsi que des molécules effectrices telles que FasL et la perforine. De plus, cette population exprime très fortement CD56 (CD56^{bright}). Il est généralement accepté que les cellules NK CD56^{bright} des organes lymphoïdes secondaires sont les précurseurs des cellules NK circulantes, majoritaires CD56^{dim} [197,198]. Cette dernière étape de maturation se caractérise par l'acquisition du CD16 et des KIR (Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor), associée à une

diminution de l'expression de CD94/NKG2A (**Figure 18**) [199]. De plus, la population CD56^{dim}CD16⁺ peut également être subdivisée sur la base de l'expression de la molécule d'adhésion CD57 [200].

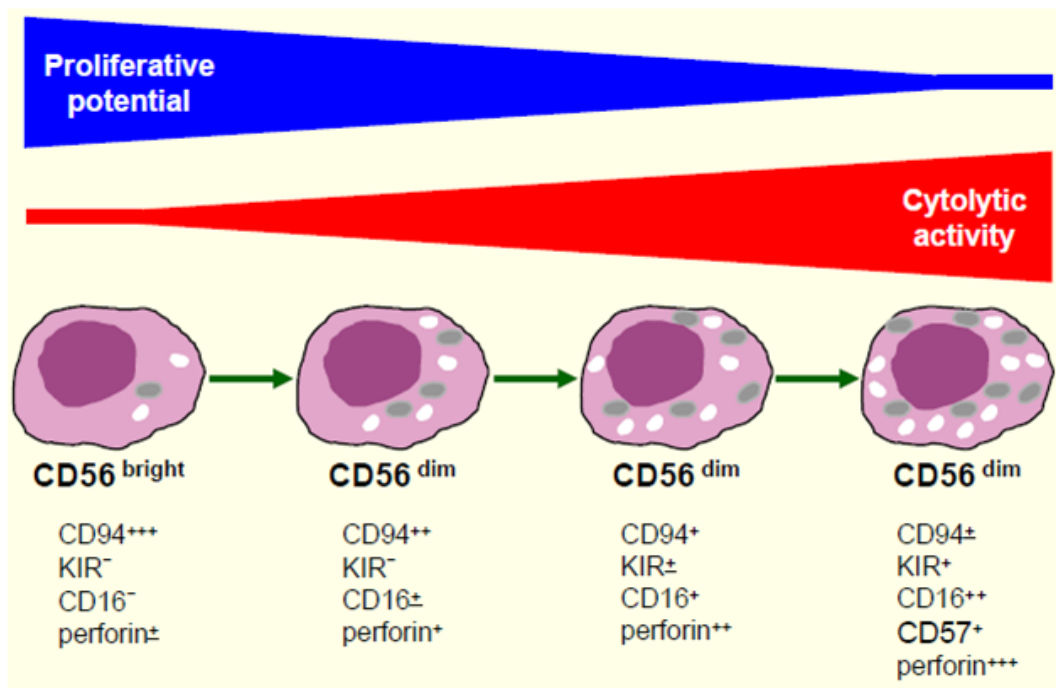


Figure 18 : Différenciation des cellules NK CD56^{bright} en CD56^{dim}. [201].

b. Facteurs de transcription

Les facteurs de transcription sont des protéines qui jouent un rôle clé dans le choix de lignage et la différenciation des cellules hématopoïétiques. Même si ils n'interviennent pas tous au même stade, plusieurs facteurs de transcription sont essentiels au développement et à la fonction des cellules NK [202]. La régulation temporelle et spatiale de l'expression de ces facteurs de transcription assure le choix du lignage et régule les fonctions effectrices des cellules NK.

Parmi les différents facteurs de transcription impliqués dans le développement des cellules NK, E4BP4 (E4 promoter Binding Protein 4) joue un rôle central car il régule la progression du stade pré-NK vers le stade iNK puis vers le stade NK matures [203,204]. Ainsi, les souris déficientes pour E4BP4 ont une accumulation de cellules pré-NK dans la moelle osseuse et un défaut fonctionnel dans les cellules NK matures. E4BP4 active également Id2 et Id3, des facteurs de transcription qui interviennent dans le choix et la fixation du lignage NK en agissant comme régulateurs de la transcription [205,206]. Les derniers stades de maturation des cellules NK, caractérisés par l'acquisition de molécules effectrices (perforine, granzymes, IFN- γ), sont sous le contrôle des facteurs de transcription Tbet et Eomes, qui régulent les fonctions effectrices [207-209]. Enfin, d'autres facteurs de transcription comme

Ets-1, Hélios, KLF4 (Krüppel-Like Factor 4), GATA3 (GATA binding protein 3) ou encore FOXO1 (Forkhead box protein O1) ont également été décrits comme intervenant dans la régulation de la différenciation et des fonctions effectrices des cellules NK [210-214]. Ces facteurs ne sont cependant pas exprimés par toutes les sous-populations de cellules NK. Ainsi, une déficience en KLF4 n'affecte que les cellules NK du sang périphérique mais pas les cellules NK tissulaires du foie ou des nœuds lymphatiques [213]. Cela suggère un rôle local du microenvironnement dans l'expression différentielle des facteurs de transcription et potentiellement dans le contrôle des fonctions effectrices des cellules NK.

c. miARN et contacts cellulaires

La régulation des miARN et la régulation post-transcriptionnelle par les miARN apparaissent de plus en plus comme essentielles à la plupart des processus physiologiques [215]. Les cellules NK expriment de nombreux miRNA (>300) [216]. De plus, des études réalisées dans des souris déficiente pour les enzymes impliquées dans la synthèse des miRNA (Dicer ou Dcgr8) ont révélé des anomalies dans le développement des cellules NK [217]. D'autres études menées chez la souris ont montré que une déficience en miR-150 (ciblant le facteur pro-survie et pro-prolifératif c-Myb) cause une diminution du nombre de cellules NK matures en périphérie [218]. Enfin, de nombreux autres miARN tels que miR-146a, miR-30b, miR-21 et miR-155 ont été impliqués dans le contrôle du développement de la maturation et de l'acquisition des fonctions effectrices des cellules NK [218-222].

Concernant les contacts cellulaires, il n'existe que peu de données sur les interactions qui régulent les différentes étapes du développement des cellules NK. Il a cependant été montré qu'une interaction des cellules NK avec les DC ou les monocytes est nécessaire à l'apport de l'IL-15 par trans-présentation [223-225]. De plus, une étude a montré que les cellules NK nécessitent une interaction avec les neutrophiles au cours de leur développement pour devenir fonctionnelles [226]. Ainsi, les neutrophiles sont retrouvés à proximité des cellules NK dans les nœuds lymphatiques et sont essentiels à leur développement dans la moelle osseuse. Ces observations ont également été confirmées chez des patients neutropéniques [226].

d. Education des cellules NK

Pendant de nombreuses années, les mécanismes permettant aux cellules NK de distinguer et tuer spécifiquement les cellules infectées ou transformées n'étaient pas connus et restaient énigmatiques. C'est en 1986, que le premier élément de réponse a été apporté par Klas Kärre qui a démontré que les cellules NK exercent leur activité cytotoxique contre des cellules qui perdent l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1 (CMH-I). Il propose alors l'hypothèse du « soi manquant » qui postule que les

cellules NK sont activées en l'absence de liaison d'une molécule de CMH-I à un récepteur inhibiteur [227,228]. Depuis la découverte de récepteurs NK, comme NKG2D, qui reconnaissent des ligands de stress plutôt que des molécules de CMH-I, la théorie a été élargie [229].

Les cellules NK sont capables de détecter et d'éliminer les cellules dépourvues de CMH-I. Cependant, chez des souris déficientes en CMH-I, les cellules NK ne sont pas autoréactives et restent tolérantes au soi [230,231]. De plus, elles présentent un défaut fonctionnel qui les empêche de tuer des cellules tumorales ou d'induire un rejet de greffe. Ces observations suggèrent que les cellules NK nécessitent une interaction entre leurs récepteurs inhibiteurs et les molécules de CMH-I pour pleinement acquérir leurs fonctions effectrices [184]. Les mécanismes qui sous-tendent cette éducation ne sont toujours pas connus et trois modèles s'opposent (**Figure 19**) :

- Le modèle « arming », qui postule que l'engagement d'au moins un récepteur inhibiteur par les molécules du CMH-I est suffisant pour induire les signaux d'éducation [232]. A l'inverse, les cellules NK qui ne pourraient se lier à aucune molécule de CMH-I resteraient anergiques et donc tolérogènes.
- Le modèle « disarming », qui postule que les signaux activateurs sont constitutivement transduits dans les cellules NK en développement. L'engagement d'un récepteur inhibiteur par le CMH-I s'opposerait à ces signaux et empêcherait les cellules NK de devenir anergiques à cause de leur activation excessive [233,234].
- Le modèle du « rhéostat », qui postule que l'amplitude de la réponse des cellules NK est dépendante du nombre de récepteurs inhibiteurs engagés par le CMH-I [235]. Ainsi, une cellule NK possédant deux récepteurs inhibiteurs sera plus réactive qu'une cellule NK n'en exprimant qu'un seul [236].

En accord avec ces trois modèles, il semblerait que l'éducation et donc la réactivité des cellules NK soit modulable en fonction de l'environnement dans lequel elles se trouvent ; on parle alors de « tuning » de l'éducation. Ainsi, le transfert adoptif de cellules NK éduquées dans des souris déficientes en CMH-I les rend hypo-répondeuses et anergiques. Au contraire, le transfert de cellules NK non éduquées à des souris compétentes pour le CMH-I augmente leur réactivité et permet le développement de leurs capacités fonctionnelles [237,238].

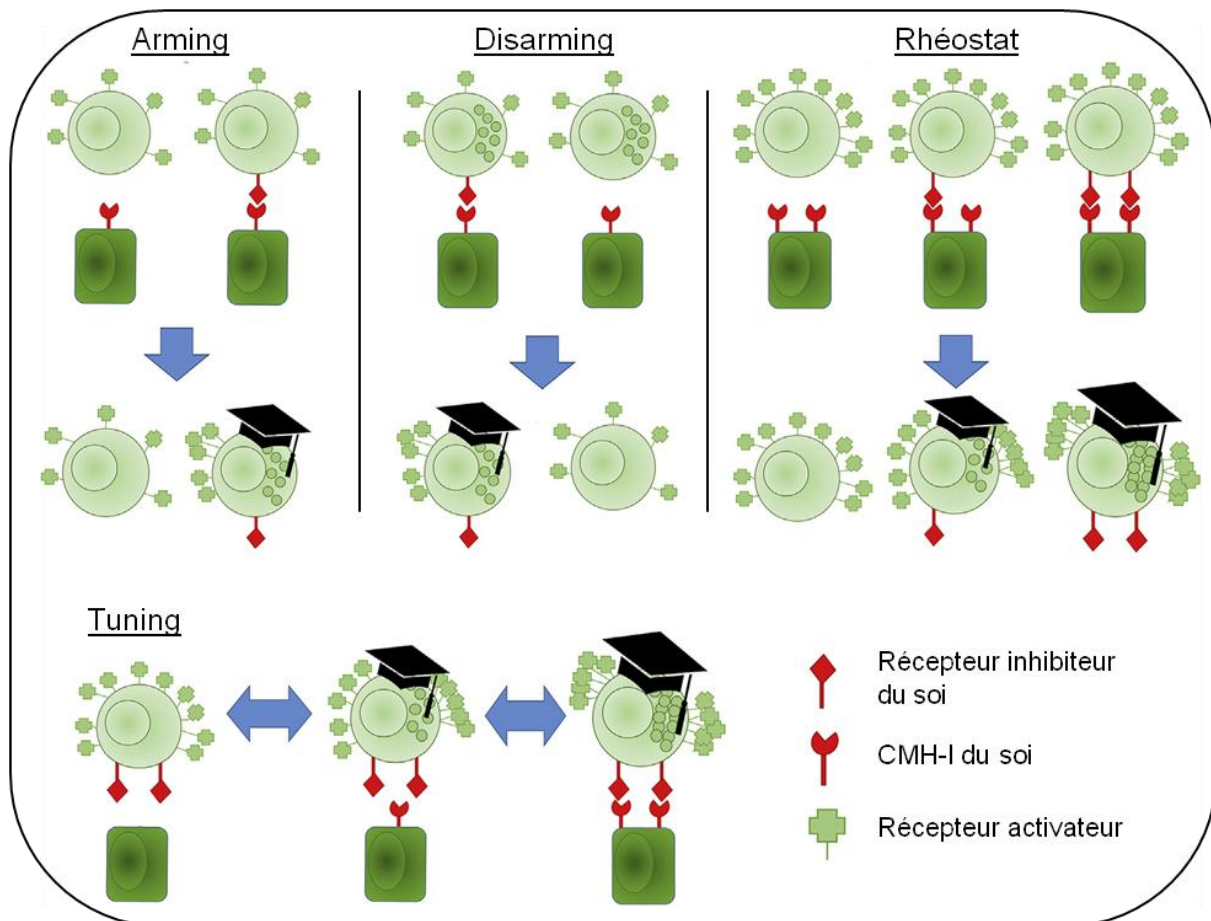


Figure 19 : Modèles d'éducation des cellules NK. Adapté de [239].

Enfin, il a été prouvé que le contexte cytokinique peut également participer à l'éducation des cellules NK. En effet, la présence d'IL-15 et d'IL-18 est nécessaire pour que les cellules NK acquièrent leurs fonctions effectrices optimales [240,241]. Cela pourrait expliquer l'augmentation de la réactivité des cellules NK lors d'infections ou dans des conditions inflammatoires propices à la sécrétion de cytokines. Ainsi, l'éducation et donc la réactivité des cellules NK semblent être modulable selon le microenvironnement local, permettant l'activation des cellules NK de façon indépendante du CMH-I en fonction du contexte physiologique.

2. Les récepteurs des cellules NK et leurs ligands

Les cellules NK expriment de nombreux récepteurs (NKR) qui peuvent être soit activateurs soit inhibiteurs et qui, contrairement aux LT et aux LB, ne subissent aucun réarrangement génique durant leur développement. Ce répertoire complexe de récepteurs permet une régulation fine de la fonction des cellules NK afin qu'elles puissent protéger l'hôte quand c'est nécessaire tout en évitant une sur-activation potentiellement délétère (**Figure 20**).

Les récepteurs des cellules NK sont majoritairement de deux types :

- Glycoprotéines monomériques de la superfamille des immunoglobulines (Ig). La majorité des gènes codants pour ces récepteurs de type Ig sont regroupés dans le locus LRC (Leukocyte Receptor Complex) localisé sur le chromosome 19q13 [242].
- Glycoprotéines de type lectine. Les gènes codants pour ces récepteurs sont localisés dans le locus NKC (Natural Killer Complex) situé sur le chromosome 12p12-13 [243].

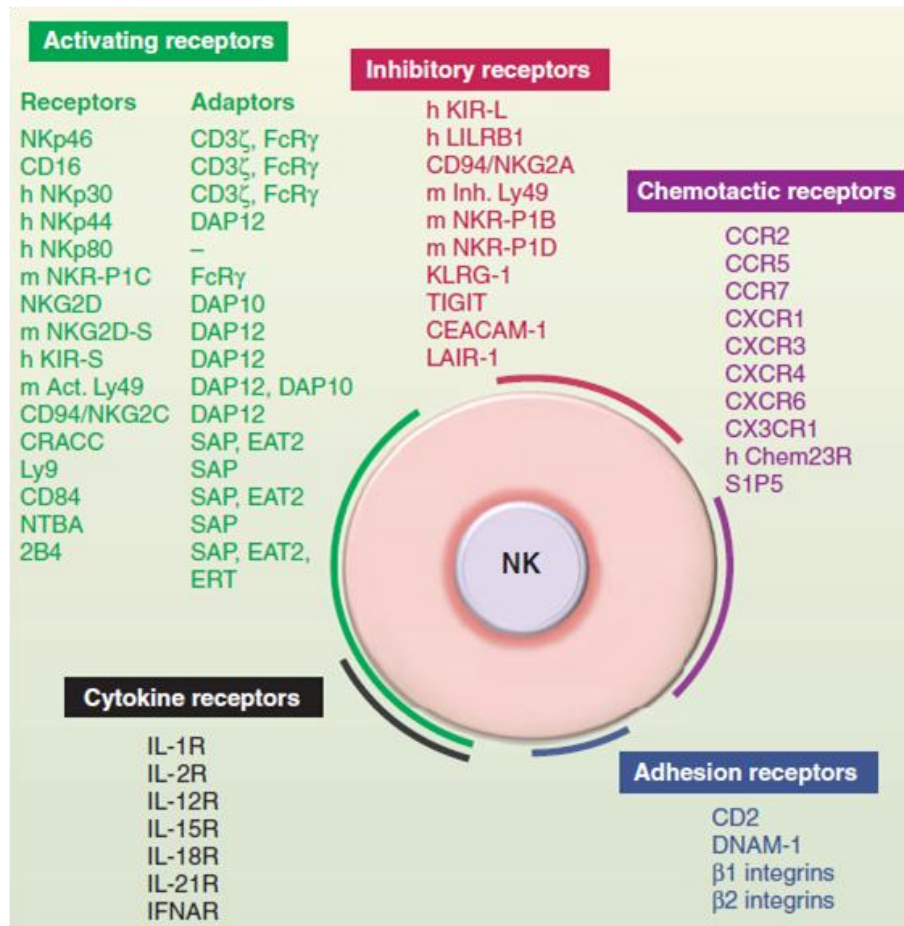


Figure 20 : La grande diversité des Récepteurs NK (NKR). [244].

Les ligands des NKR sont majoritairement des molécules de CMH-I (Human Leukocyte Antigen, HLA chez l'Homme) ou des molécules apparentées. Chaque molécule de HLA-I est un hétérodimère composé d'une chaîne lourde α qui est très polymorphique et associée à la membrane plasmique, et d'une chaîne légère β 2-microglobuline (β 2M) non polymorphique [245]. Les molécules de HLA sont codées à partir du locus *HLA* localisé sur le chromosome 6 et sont divisées en deux catégories. Les molécules de HLA classiques sont exprimées par la majorité des cellules nucléées. Ce groupe est hautement polymorphique et contient tous les allèles de HLA-A, HLA-B et HLA-C. Les molécules de HLA-I non classiques sont au contraire moins polymorphiques et leur distribution tissulaire est plus restreinte. Dans ce second groupe, on trouve les molécules HLA-E, HLA-F et HLA-G.

L'état d'activation des cellules NK résulte de la somme des signaux activateurs et inhibiteurs

intégrés en continu par ces cellules. Chaque cellule NK exprime de façon clonale un répertoire unique de récepteurs activateurs et inhibiteurs qui lui confère une certaine spécificité. Cette spécificité dépend également de la nature de récepteurs activateurs engagés, chacun pouvant transduire des signaux plus ou moins forts. On considère généralement que les signaux transmis par les récepteurs inhibiteurs bloquent les signalisations activatrices et sont dominants [246]. Enfin, l'activation des cellules NK ne résulte pas de la simple addition des différents signaux activés en parallèle. Certains signaux peuvent avoir un effet synergique alors que d'autres n'augmentent que peu ou pas l'état d'activation. De plus, les cellules NK s'activent en plusieurs étapes qui impliquent chacune l'engagement spécifique de récepteurs différents [247].

- *Killer Ig-like Receptors (KIR)*

La famille des KIR (CD158a-k, z) est composée de 15 gènes. Ces récepteurs sont classés en fonction de la taille de leur région intracellulaire (S pour une région courte et L pour une région longue) du nombre de domaine Ig dans leur région extracellulaire (2 ou 3). Ils sont alors nommé KIR(2/3)D(L/S) suivi d'un nombre (**Figure 21**) [248]. La taille de la région intracellulaire définit si le récepteur est activateur ou inhibiteur. Ainsi, les KIR-L sont inhibiteurs et transmettent des signaux négatifs grâce aux motifs ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif) présents dans leur longue région cytoplasmique. A l'inverse, les KIR-S sont activateurs et ne peuvent transmettre des signaux positifs qu'après le recrutement de molécules adaptatrices portant des motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) [249]. De par la grande quantité de gènes qu'ils contiennent, les haplotypes KIR présentent une grande diversité. Cette diversité s'explique notamment par de nombreuses duplications et recombinaisons au niveau du locus *KIR* [250,251]. Les cellules NK n'expriment pas tous les KIR mais seulement une combinaison de KIR, spécifique à chaque cellule.

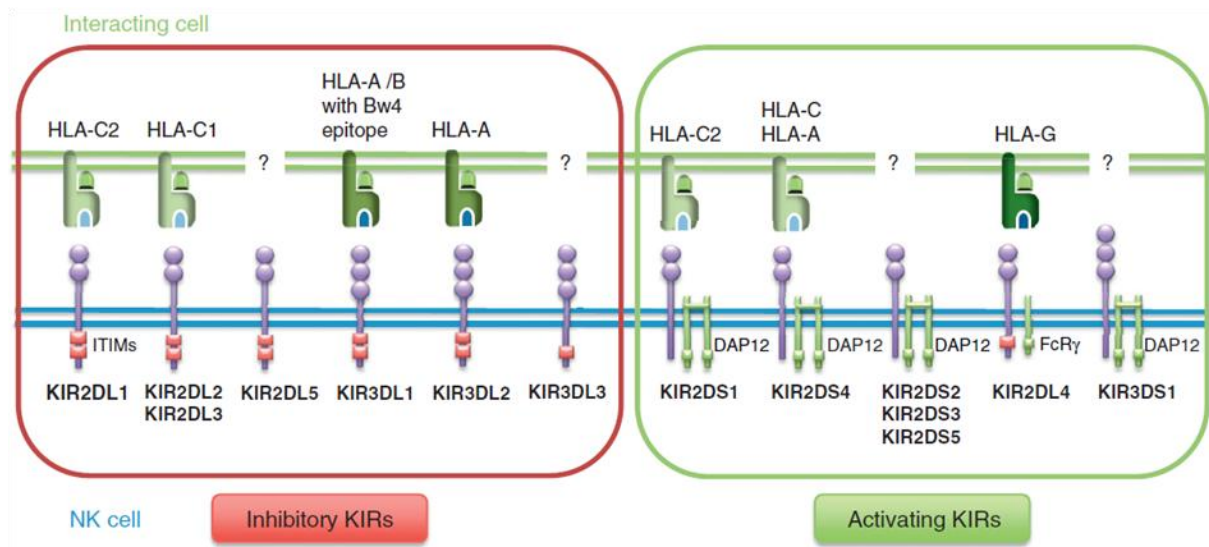


Figure 21 : Les récepteurs KIR et leurs ligands. [252].

Le KIR2DL4 est une exception car il permet la transduction d'un signal activateur malgré la présence d'un motif ITIM dans leur région cytoplasmique [253,254]. En effet, le KIR2DL4 est capable de s'associer à la molécule adaptatrice FcεR1γ qui va transmettre un signal positif *via* ses motifs ITAM. Il a notamment été montré que l'engagement spécifique du KIR2DL4 par un anticorps spécifique induit la sécrétion d'IFN-γ par les cellules NK [255]. Enfin, le KIR2DL4 a également la particularité d'être exprimé par toutes les cellules NK [250].

Pour qui concerne leurs ligands, les KIR-L peuvent se lier à plusieurs allèles de HLA-A, HLA-B et HLA-C alors que les ligands des KIR-S ne sont que peu connus. De manière générale, les KIR3D sont spécifiques de HLA-A et HLA-B alors que les KIR2D sont spécifiques de HLA-C. Seul le KIR2DL4 est une exception car il reconnaît HLA-G [256]. Si on étudie l'interaction KIR-HLA plus en détails, les domaines Ig des KIR2D entrent en contact avec les hélices α1 et α2 des molécules de HLA-C par le biais de liaisons hydrogènes. De plus, la séquence linker entre les deux domaines Ig interagit directement avec le peptide présenté par le HLA. Des expériences de mutagenèse ont prouvé que cette interaction est nécessaire à la stabilité de la liaison KIR/HLA [257]. Ainsi, la nature du peptide présenté par le HLA va permettre de contrôler la reconnaissance par la cellule NK. Concernant les KIR3D, la reconnaissance des molécules de HLA-A et HLA-B est identique à celle des KIR2D (liaisons hydrogènes et *via* le linker).

- Leucocytes Ig-like Receptors (LILR)

La famille des LILR est composée de 13 membres dont 6 récepteurs activateurs (LILRA), 5 récepteurs activateurs (LILRB) et deux pseudogènes. Le locus des *LILR* est composé de deux clusters qui résultent de la duplication puis de l'inversion d'un locus originel [258,259].

Les LILR sont génétiquement proche des KIR mais sont beaucoup moins variables, malgré un certain niveau de polymorphisme [260].

Les LILR sont des récepteurs transmembranaires constitués de deux ou quatre domaines Ig dans leur région extracellulaire. La seule exception est le LILRA3 qui n'a pas de domaine transmembranaire. De manière similaire aux KIR, on retrouve des LILR activateurs avec des régions intracellulaires courtes et des LILR inhibiteurs avec des régions intracellulaires longues [261]. De plus, les ARN messagers des LILR peuvent être épissés et donner des protéines solubles qui entrent en compétition avec les récepteurs membranaires [262]. Les cellules NK expriment majoritairement le récepteur inhibiteur LILRB1 (ou ILT2 pour Immunoglobulin Like Transcript 2) alors que les autres membres sont plutôt exprimés par les cellules de la lignée myéloïde [261]. L'expression d'autres membres des LILR comme LILRB2 peut également être induite dans les cellules NK en conditions inflammatoires [263]. L'activation d'ILT2 traduit un signal inhibiteur qui bloque la réorganisation du cytosquelette d'actine et inhibe la polarisation des granules lytiques ainsi que la sécrétion d'IFN- γ [264,265].

La particularité des récepteurs LILR exprimés par les cellules NK est leur capacité à reconnaître les molécules de HLA-I classiques mais également non classiques [261]. Cette propriété est due au mode de reconnaissance des molécules de HLA-I par les LILR. En effet, contrairement aux KIR qui se lient aux régions $\alpha 1$ et $\alpha 2$ très polymorphes, les LILR interagissent avec l'hélice $\alpha 3$ qui est peu variable et à la $\beta 2M$ par le peptide linker [266]. Enfin, malgré le fait que les LILR soient des récepteurs pan-HLA-I, l'identité du peptide présenté et le polymorphisme du CHM-I jouent quand même un rôle dans la reconnaissance par ces récepteurs [267]. ILT2 est également capable de reconnaître des molécules homologues au HLA-I telles que la protéine UL18 du HCMV qui lie ILT2 avec une très forte affinité [268-270].

- Récepteurs de Cytotoxicité Naturelle (NCR)

La famille des NCR comporte trois membres, identifiés et clonés entre 1997 et 1999 par le groupe de Alessandro et Lorenzo Moretta [271-273]. Leur nom vient de leur capacité à déclencher l'activité cytotoxique des cellules NK contre des cibles transformées ou infectées, en l'absence de toute autre stimulation [274]. Ce sont des récepteurs de type Ig qui transmettent de forts signaux activateurs après engagement par leurs ligands. De plus, le niveau d'expression des NCR à la surface des cellules NK est intimement lié à leur potentiel cytotoxique. En effet, un faible niveau d'expression des NCR est associé à une résistance des cellules tumorales à la lyse par les cellules NK chez des patients atteints de leucémie [275,276]. La famille des NCR est composée de trois membres : Nkp46, NKp44 et NKp30

(CD335, CD336 et CD337 respectivement) (**Figure 22**).

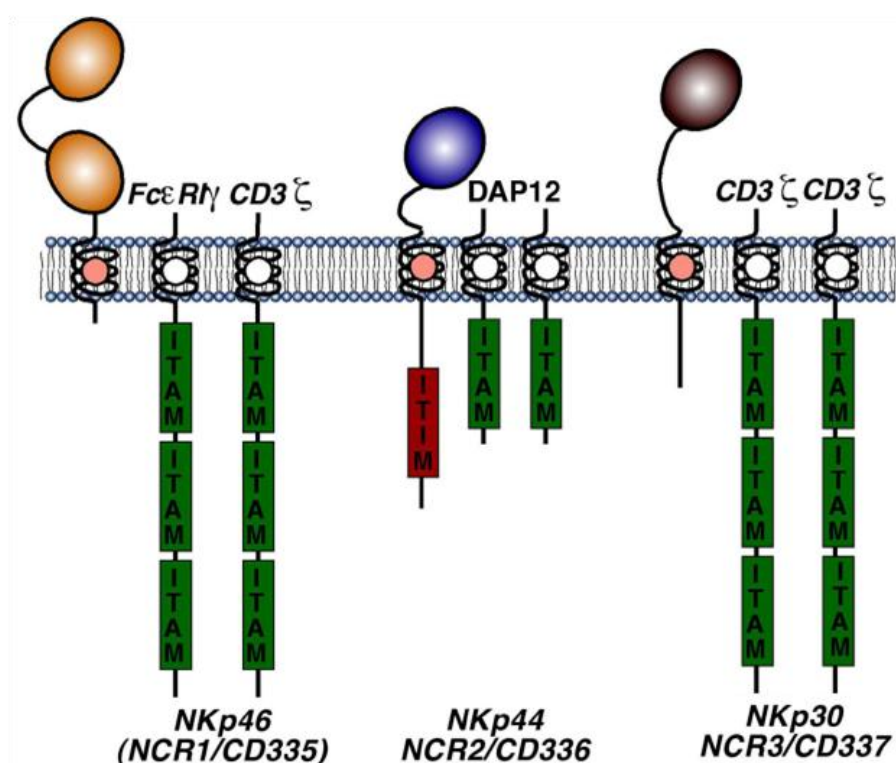


Figure 22 : Structure des Récepteurs de Cytotoxicité Naturelle. [277].

NKp46 est le seul NCR conservé au cours de l'évolution chez tous les mammifères. Il est codé par le gène *NCR1* localisé sur le chromosome 19 et est exprimé par toutes les cellules NK matures [278]. Son nom vient du fait qu'il migre à 46 kDa en Western Blot.

NKp44 est le seul NCR qui n'est pas exprimé constitutivement par les cellules NK mais qui nécessite une activation préalable pour être induit [279]. Il est codé par le gène *NCR2* localisé sur le chromosome 6. *NCR2* est soumis à un épissage alternatif qui influencera sa région intracellulaire. Elle est majoritairement courte mais il existe deux autres isoformes de NKp44 qui ont une région intracellulaire longue portant un motif ITIM. Cependant, la présence de ce motif ne semble pas associée à des fonctions inhibitrices [280].

NKp30 est codé par le gène *NCR3*, localisé sur le chromosome 6. Tout comme pour NKp44, le gène *NCR3* est transcrit en plusieurs variants d'épissage qui modifient la fonction du récepteur. *NCR3* est composé de 4 exons et a pour particularité d'avoir trois exons 4 (codants pour le domaine Ig intracellulaire). En fonction de l'exon qui sera conservé lors de l'épissage, NKp30 aura des fonctions très différentes [281]. Ainsi, l'isoforme « a » (NKp30a) est capable d'induire la cytotoxicité et la production de cytokines, l'isoforme « b » (NKp30b) induit uniquement la production de cytokines et l'isoforme « c » (NKp30c) est inhibitrice. De plus, l'expression relative de chaque isoforme influence la réponse des cellules NK après l'engagement de NKp30. Enfin, en plus de son rôle clé dans l'immunité anti-tumorale, le

récepteur NKp30 est également important dans l'homéostasie des DC car il permet de déclencher la lyse des DC immatures ou mal activées [282].

D'un point de vue structural, les récepteurs NKp30 et NKp46 possèdent un et deux domaines extracellulaires Ig-like respectivement, et s'associent avec les protéines adaptatrices CD3 ζ et Fc ϵ R1 γ (**Figure 22**) [283]. Le récepteur NKp44 quant à lui possède un domaine extracellulaire Ig-like et s'associe à la protéine adaptatrice DAP12 [284].

Les ligands des NCR sont multiples et incluent des protéines du soi ou du non soi qui sont surexprimées durant la transformation tumorale ou lors d'une infection virale. Le seul ligand endogène connu (et récemment identifié) de NKp46 est le facteur P du complément [285]. PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) et MLL5 (Mixed-Lineage Leukemia-5) sont des protéines exprimées à la surface des cellules transformées, et qui ont été décrites comme étant des ligands de NKp44 [286,287]. Toutefois, il a été montré que ces deux ligands induisent des réponses différentes. En effet, MLL5 entraîne l'activation des cellules NK alors que PCNA inhibe les fonctions effectrices des cellules NK. Cet effet de PCNA est dû à sa liaison avec des isoformes inhibitrices de NKp44 [288]. Il a également été montré que NKp44 et NKp46 ont des ligands viraux communs tels que les glycoprotéines d'enveloppe des virus de la dengue et du Nil occidental ainsi que les hémagglutinines du virus Influenza, du virus de la maladie Newcastle et du virus Sendai [289-292]. Le virus Influenza utilise cette reconnaissance comme un mécanisme d'évasion en produisant de l'hémagglutinine soluble qui va se fixer à NKp46 et conduire à la dégradation de la protéine adaptatrice CD3 ζ [293]. L'hémagglutinine des Poxvirus a également été décrite comme étant un ligand de NKp46 et de NKp30, mais pas de NKp44 [294]. Enfin, il a été récemment découvert que NKp44 peut interagir avec le PDGF-DD (Platelet-Derived Growth Factor-DD) sécrété par les tumeurs [295]. Cette reconnaissance active alors les fonctions effectrices des cellules NK et représente un nouveau mécanisme de l'activité anti-tumorale.

Il a été montré que NKp30 a pour ligand la molécule B7-H6, qui n'est pas exprimée dans les tissus sains, mais le devient dans des contextes inflammatoires ou tumoraux [296,297]. Les protéines PfEMP-1 (*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein-1), BAT3 (HLA-B-Associated Transcript 3) et les héparanes sulfates ont aussi été décrites comme étant des ligands de NKp30 [298-300]. Enfin, la protéine tégumentaire pp65 du HCMV est capable de lier NKp30 et d'inhiber les cellules NK, constituant alors un mécanisme d'évasion viral [301].

- Hétérodimères CD94/NKG2

Les récepteurs de la famille NKG2 sont des glycoprotéines transmembranaires de type II de la famille des lectines-C et qui sont présents chez l'Homme et la souris. Cette famille compte sept membres nommés NKG2A, B, C, D, E, F et H. Parmi ces récepteurs, cinq molécules

NKG2 (NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E et NKG2F) se lie à une chaîne invariante CD94 par des ponts disulfures [302]. CD94 n'a pas de domaine intracellulaire et ne peut donc pas transduire de signal. Il est cependant nécessaire à la localisation membranaire des molécules NKG2. Les hétérodimères CD94/NKG2 sont exprimés par la plupart des cellules NK, par les LT $\gamma\delta$ et certaines sous populations de LT CD8 [303,304].

Les récepteurs NKG2A et NKG2B, qui résultent de l'épissage alternatif d'un même gène, sont des récepteurs inhibiteurs avec deux motifs ITIM dans leur domaine intracellulaire [305]. Les autres récepteurs associés à CD94 sont des récepteurs activateurs. NKG2E et NKG2H sont également issus de l'épissage alternatif d'un même gène, ce qui n'est pas le cas de NKG2C. Comme pour les récepteurs activateurs de la famille Ig, ces récepteurs n'ont pas de domaine intracellulaire et doivent s'associer à une molécule adaptatrice (DAP12) qui porte des motifs ITAM pour transmettre les signaux positifs [306].

Les hétérodimères CD94/NKG2A, NKG2B et NKG2C ont pour ligand la molécule HLA de classe I non classique HLA-E [307,308]. HLA-E présente des peptides dérivés de la séquence leader des molécules de CMH-I classiques et de la molécule de CMH-I non classique HLA-G. Ainsi, HLA-E indique que la dégradation et la présentation antigénique ne sont pas altérées dans les cellules. Par comparaison aux gènes de HLA-I classiques, le polymorphisme allélique de HLA-E est limité. L'affinité entre les hétérodimères CD94/NKG2 et HLA-E est variable. Ainsi, CD94/NKG2A se lie plus fortement à HLA-E que CD94/NKG2C [309,310]. Il a également été montré que la spécificité de l'interaction avec HLA-E dépend de CD94 alors que l'affinité de l'interaction dépend de la nature de la sous-unité NKG2 [311]. Enfin, le répertoire peptidique présenté par HLA-E n'est pas uniquement restreint aux molécules de HLA-I. Ainsi, en conditions de stress cellulaire, HLA-E est capable de présenter un peptide dérivé de Hsp60 (Heat Shock Protein 60) [312]. HLA-E n'est alors plus reconnu par l'hétérodimère CD94/NKG2A, ce qui lève l'inhibition des cellules NK et favorise leur réponse effectrice. Au contraire, le HCMV code pour la protéine UL40 qui peut être apprêtée et présentée par HLA-E [313]. Comme CD94/NKG2A a la plus grande affinité pour HLA-E, la présentation d'UL40 aura pour conséquence d'augmenter la signalisation inhibitrice pour échapper à la lyse des cellules infectées par les cellules NK.

- Homodimère NKG2D

Le récepteur NKG2D appartient à la famille des récepteurs NKG2 mais ne présente que peu de similitudes avec les autres membres de cette famille. Plutôt que de s'associer au CD94, il forme un homodimère avec une autre molécule NKG2D par l'intermédiaire de ponts disulfures [314]. Le récepteur NKG2D est codé par le gène *KLRK1* localisé sur le chromosome 12. Il est très peu polymorphe et possède seulement deux allèles qui ne

différent que d'un acide aminé [315]. NKG2D est un récepteur activateur qui reconnaît des molécules de stress cellulaire pouvant également être induites durant une infection virale ou durant la transformation tumorale [316]. Chez l'Homme, le récepteur NKG2D n'a qu'une isoforme et induit une signalisation activatrice *via* le recrutement de la molécule adaptatrice DAP10 au niveau de sa région intracytoplasmique ; interaction qui participe également à stabiliser NKG2D à la membrane plasmique [314,317].

Le récepteur NKG2D est exprimé par la majorité des cellules NK mais aussi par les LT, notamment par les LT CD8 à qui il confère des propriétés « innate-like » [171]. De plus, l'expression NKG2D est dépendante du microenvironnement cytokinique. Ainsi, les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-15 induisent l'expression de NKG2D, alors que les cytokines anti-inflammatoires telles que le TGF- β l'inhibent [318,319].

Les ligands de NKG2D sont des molécules apparentées au HLA-I mais qui ne présentent pas de peptides. Ainsi, NKG2D est capable de se lier aux protéines MICA et MICB (MHC class I Chain-related A and B) et aux protéines ULBP-1 à 6 (UL16 Binding Protein) [316,320-322]. Ces ligands ne sont que peu exprimés à la surface cellulaire en conditions physiologiques. En revanche, ces molécules sont induites en réponse à des stress cellulaires qui compromettent l'intégrité de l'ADN (choc thermique, stress oxydatif, irradiation par des rayonnements ultraviolets, ...). L'engagement de NKG2D par ses ligands permet l'activation des fonctions effectrices des cellules NK (libération des granules lytiques, production de cytokines) et contribue à la survie cellulaire.

- Cytotoxicité Cellulaire Dépendante des Anticorps (ADCC)

L'infection de l'hôte permet la mise en place d'une réponse anticorps spécifique contre les antigènes du pathogène qui est médiée par les LB. Le processus d'opsonisation des cellules infectées par les anticorps les rend susceptibles à la lyse par les protéines du complément mais également par les cellules cytotoxiques qui reconnaissent le fragment constant (Fc) des Ig. Les cellules NK expriment majoritairement le CD16 (Fc γ RIII) mais aussi le CD32 (Fc γ RII) [323,324]. Le récepteur CD16, codé par le gène *FCGR3* localisé sur le chromosome 1, est exprimé par toutes les cellules NK CD56^{dim} mais aussi par les monocytes/macrophages, les neutrophiles et certains LT $\gamma\delta$. Il existe deux isoformes de CD16 chez l'Homme (CD16a et CD16b) qui ont 96% d'identité de séquence et possèdent deux domaines Ig séparés par un peptide linker [325,326]. Les cellules NK expriment majoritairement le CD16a, qui transmet un signal activateur *via* les molécules adaptatrices CD3 ζ et Fc ϵ RI γ [327]. Même si il est un récepteur de faible affinité, CD16 est un des seuls récepteur activateur des cellules NK qui peut induire une activité cytotoxique en l'absence d'autres signaux [328].

- Récepteur CD160

CD160 est un récepteur activateur de type Ig qui est codé par le gène *CD160* localisé sur chromosome 1 [329]. Il est exprimé pas les cellules NK, les LT circulants mais aussi par les LT de l'intestin et les cellules endothéliales activées [329-332]. CD160 possède un domaine Ig-like extracellulaire qui lui permet d'interagir avec des molécules de HLA-I classiques et non classiques telles que HLA-C et la forme soluble de HLA-G [330,333].

Le récepteur CD160 est exprimé par les cellules NK CD56^{dim} non activées et son expression diminue après activation, suite à un clivage protéolytique [334,335]. Après engagement par son ligand, CD160 participe aux fonctions effectrices des cellules NK (cytotoxicité et production d'IFN- γ , TNF- α et IL-6) [333,336]. Enfin, en utilisant un modèle de souris CD160^{-/-}, il a été montré que ce récepteur est essentiel à la production d'IFN- γ par les cellules NK [337].

- Co-récepteur DNAX Accessory Molecule 1 (DNAM-1)

DNAM-1 (CD226) est un récepteur activateur de type Ig qui est codé par le gène *CD226* localisé sur chromosome 18. Il est exprimé par les cellules NK mais aussi par les LT, les LB, les monocytes et les plaquettes [338,339]. Les ligands de ce récepteur sont les molécules CD112 (PVR, Poliovirus Receptor) et CD155 (Nectine 2), qui sont souvent surexprimées par les cellules transformées [340,341]. DNAM-1 est considéré comme un co-récepteur car il n'est pas suffisant pour induire les fonctions effectrices des cellules NK. Au contraire, il agit en synergie avec d'autres récepteurs activateurs tels que CD16, NKp46 ou NKG2D pour potentialiser leur activation [328,342]. De plus, de par son interaction avec la molécule LFA-1 (Lymphocyte Function-associated Antigen 1), DNAM-1 facilite la prolifération et la différenciation des LT [343]. Enfin, DNAM-1 semble également impliqué dans l'éducation et la maturation des cellules NK [344,345]. Il a notamment été montré qu'il est nécessaire à la différenciation des cellules NK dans un modèle d'infection par le MCMV [346].

- Co-récepteur 2B4

2B4 (CD244) est un membre du groupe des molécules SLAM (Signaling Lymphocyte Activation Molecule), qui font partie de la famille des récepteurs CD2. Le récepteur 2B4 est codé par le gène *CD244* qui est localisé sur le chromosome 1, et est exprimé par les cellules NK, les LT CD8 mémoires et les LT $\gamma\delta$ [347-349]. Le ligand de 2B4, CD48, est exprimé par les cellules lymphoïdes et myéloïdes [350]. Il a également été montré que l'expression de CD48 augmente lors de l'infection par le virus Epstein-Barr (EBV) et après une stimulation par les IFN de type I et II [351,352]. Comme pour DNAM-1, 2B4 est un co-récepteur qui n'est pas capable d'induire les fonctions effectrices des cellules NK seul [328]. Il permet

cependant d'augmenter la prolifération et d'empêcher la lyse fratricide des cellules NK [353,354]. Enfin, la région intracellulaire de 2B4 contient quatre motifs ITSM (Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif) qui peuvent avoir des fonctions opposées selon l'adaptateur recruté (SAP, SLAM-Associated Protein ou EAT-2, Ewing's sarcoma-Associated Transcript-2) [355].

- Autres récepteurs des cellules NK

En plus des récepteurs activateurs et inhibiteurs, les cellules NK expriment également des TLR (Toll-Like Receptors), des récepteurs aux cytokines et aux chimiokines. Ces récepteurs participent au processus de développement et/ou aux fonctions effectrices des cellules NK.

Les cellules NK expriment différents TLR tels que TLR2, TLR3, TLR5, TLR7/8 et TLR9 qui permettent, après engagement par leurs ligands respectifs, d'induire leurs fonctions effectrices [356,357]. De plus, le KIR3DL2 exprimé à la surface des cellules NK est capable de se fixer aux motifs CpG et de les transporter dans les endosomes précoces pour engager le TLR9 et permettre la sécrétion d'IFN- γ [358].

Les cellules NK expriment également les récepteurs de l'IL-1, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 et aux IFN de type I. Ces récepteurs sont impliqués dans la prolifération, la cytotoxicité et la production de cytokines par les cellules NK [244]. Ces cytokines sont notamment produites par les DC myéloïdes (IL-12, IL-15), les DC plasmacytoïdes (IFN- α/β), les LT (IL-2, IL-21) et les monocytes/macrophages (IL-12/IL-18).

Enfin, les cellules NK expriment de nombreux récepteurs aux chimiokines qui permettent leur migration vers les sites inflammatoires ou les organes lymphoïdes. Elles expriment notamment les récepteurs CCR2, CCR5, CCR7, CXCR1, CXCR3, CXCR4, CXCR6, CX3CR1 et S1PR5 [359]. L'expression des ligands de ces récepteurs varie en fonction des tissus. Ainsi, CCL-21 (ligand de CCR7) est exprimé préférentiellement dans les organes lymphoïdes. Au contraire, la sphingosine-1-phosphate ou S1P (ligand de S1PR5) est présente dans le sang et permet la sortie des cellules NK des tissus. CXCR3 permet quant à lui le recrutement des cellules NK vers les sites inflammatoires. La migration des cellules NK à travers les tissus et les vaisseaux sanguins nécessite également l'expression de molécules d'adhésion telles que les sélectines (CD62L) et les intégrines (LFA-1 et ICAM-1).

3. Signalisation des récepteurs NK

Les récepteurs activateurs des cellules NK ont une région intracytoplasmique courte et nécessitent le recrutement de protéines adaptatrices transmembranaires pour transmettre leurs signaux positifs. Ces adaptateurs sont le CD3 ζ , Fc ϵ R1 γ , DAP12 et DAP10.

L'association avec le récepteur activateur de la cellule NK se fait préférentiellement *via* des associations non covalentes entre des résidus lysine ou arginine et des résidus glutamate ou aspartate de l'adaptateur [249].

a. Molécules CD3 ζ , Fc ϵ RI γ et DAP12

Les molécules adaptatrices CD3 ζ , Fc ϵ RI γ et DAP12 sont recrutées au niveau du récepteur activateur après engagement par son ligand et permettent la transduction du signal. Elles possèdent un ou plusieurs motifs ITAM qui sont caractérisés par une séquence Yxx(L/I/V)_x(₆₋₈)Txx(L/I/V) [360]. Après engagement d'un récepteur par son ligand, les tyrosines des motifs ITAM sont phosphorylées par des tyrosines kinases de la famille Src telles que Lck, Lyn ou Fyn (**Figure 23**). Après phosphorylation, les motifs ITAM se lient au domaine SH2 (SRC Homology 2) des protéines kinases Syk (Spleen Tyrosine Kinase) et de ZAP70 (ζ chain-associated protein of 70 kDa) de la famille Syk [361]. Ces kinases vont permettre d'initier une cascade de signalisation dans les cellules NK qui aboutira au déclenchement de la cytotoxicité et à la libération des cytokines/chimiokines [362]. Syk et ZAP70 vont notamment permettre d'enclencher la voie de la PLC γ (Phospholipase C γ) et la voie PI3K (Phosphoinositide 3-Kinase) qui sont les voies d'activation majeures des cellules NK [363,364].

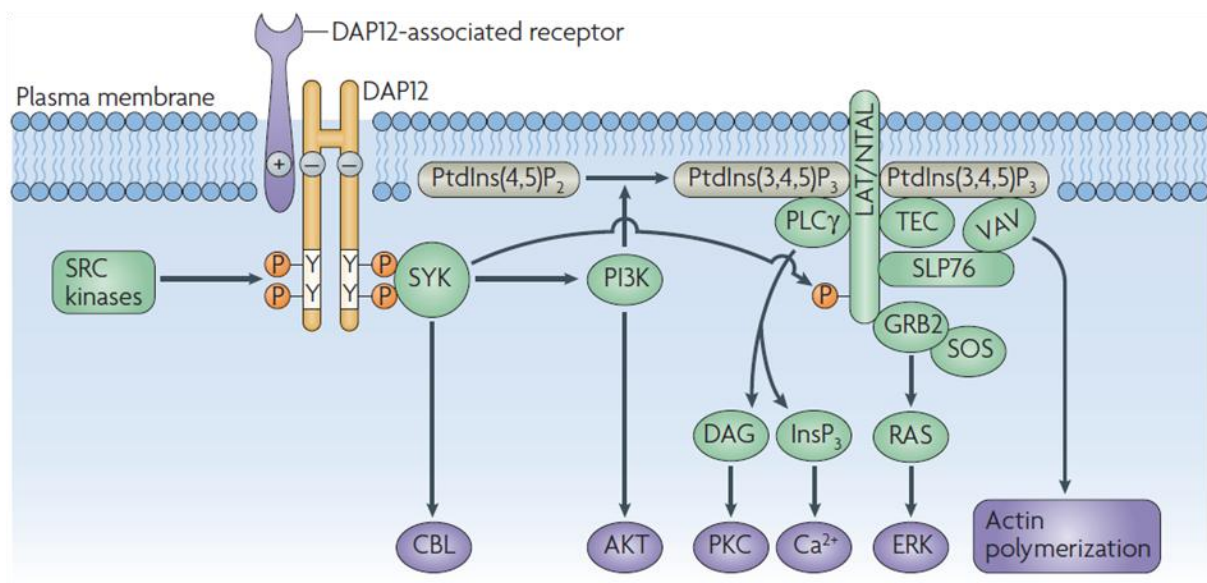


Figure 23 : Signalisation induite par la molécule adaptatrice DAP12. [365].

La PLC γ va ensuite permettre l'activation de :

- La voie calcique (Ca²⁺) qui va permettre la translocation nucléaire du facteur de transcription NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells) et activer la transcription des gènes codant pour les cytokines,

- La voie des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases), via la kinase ERK (Extracellular signal-Regulated Kinases), qui régule des gènes essentiels à l'activation cellulaire,
- La voie PKC γ (Protéine Kinase C γ) qui active et permet la translocation nucléaire du facteur de transcription NF- κ B [366,367].

De son côté, la PI3K va permettre l'activation de la voie AKT qui régule la prolifération et la survie cellulaire, et l'activation de différentes molécules de signalisation dont la protéine Vav qui participe au réarrangement du cytosquelette et à la mise en place de la cytotoxicité [366,368].

b. Molécule DAP10

La molécule adaptatrice DAP10 possède une séquence YxxM dans sa région intracellulaire et ne s'associe qu'avec le récepteur activateur NKG2D. Le motif YxxM est phosphorylé après engagement de NKG2D, ce qui permet le recrutement de la PI3K et de l'adaptateur Grb2 via leurs domaines SH2 (**Figure 24**) [369,370]. Elle permet également l'activation de la voie de signalisation PLC γ . La signalisation induite par DAP10 diffère de celle induite par les autres adaptateurs car elle n'est pas dépendante des kinases Syk. Ainsi, même si NKG2D permet l'activation de la fonction cytotoxique des cellules NK, l'implication de DAP10 dans la sécrétion des cytokines n'est pas clairement définie [371]. La différence de signalisation entre DAP10 et les autres molécules adaptatrices peut également s'expliquer par la nature des protéines Vav activées. Ainsi, la signalisation en aval de DAP10 active Vav1 alors que celle de DAP12 active Vav2 et Vav3, indispensables à la production d'IFN- γ par les cellules NK [372].

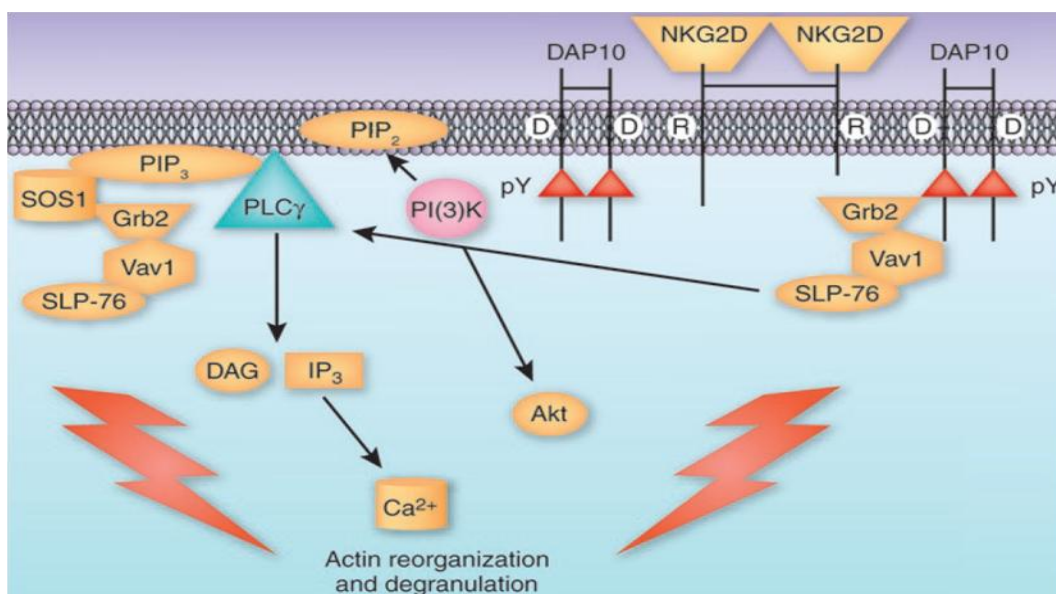


Figure 24 : Signalisation induite par la molécule adaptatrice DAP10. [249].

c. Molécules adaptatrices du récepteur 2B4

2B4 et les autres récepteurs de la famille du CD2 interagissent *via* leurs motifs ITSM (TxYxx(V/L/I)) intracellulaires avec les domaines SH2 des molécules de la famille SAP. Cette famille regroupe trois membres dont SAP et EAT-2 qui sont exprimés chez l'Homme [373,374]. La particularité de ces molécules est qu'elles transmettent des signaux opposés (**Figure 25**). SAP transmet un signal activateur en recrutant la kinase Fyn alors qu'EAT-2 transmet un signal inhibiteur en phosphorylant des tyrosines de la partie C-terminale, ce qui permet le recrutement de phosphatases [375,376]. Ainsi, un même récepteur peut induire une signalisation activatrice ou inhibitrice en fonction de l'adaptateur recruté. De plus, un défaut dans l'expression ou la fonction de SAP est associé à des défauts de polarisation des LT mais également à des pathologies graves telles que des syndromes lymphoprolifératifs [374,377,378].

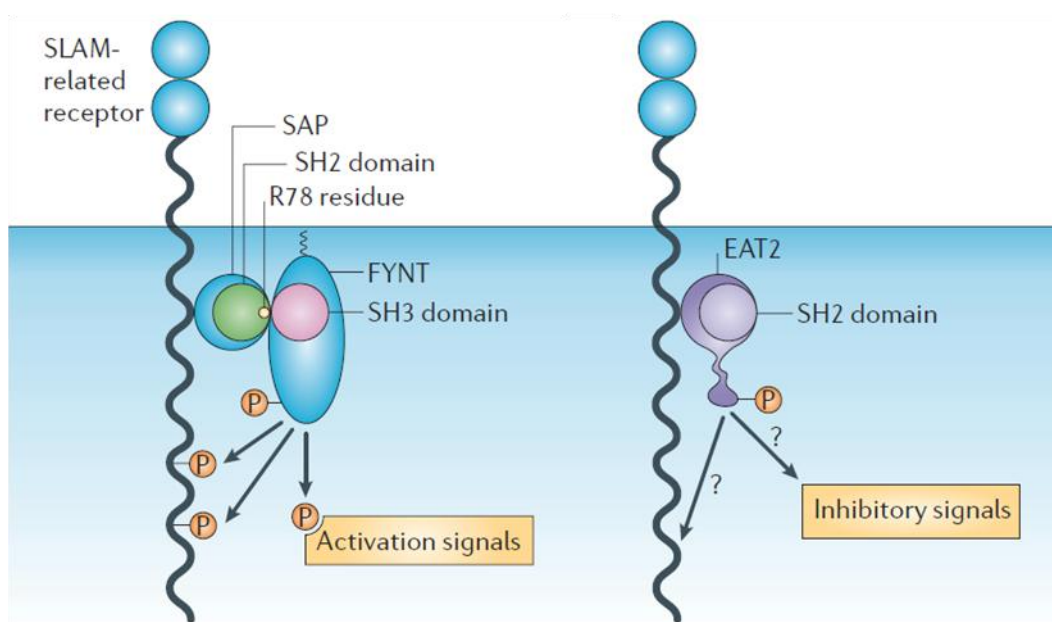


Figure 25 : Signalisation par le co-récepteur 2B4. [355].

d. Récepteurs inhibiteurs

Contrairement aux récepteurs activateurs, les récepteurs inhibiteurs des cellules NK ne nécessitent le recrutement d'aucune molécule adaptatrice. En effet, ils ont une région cytoplasmique plus longue qui possède des motifs ITIM ((I/L/V/S)xYxx(L/V)) qui sont phosphorylables [379].

L'inhibition des cellules NK par les motifs ITIM nécessite le recrutement des phosphatases SHP-1 (SH2 domain-containing Phosphatase-1) ou SHIP-1 (SH2 domain-containing Inositol 5'-Phosphatase-1). Ces phosphatases bloquant l'activation des cellules NK en déphosphorylant les substrats des kinases recrutées par les récepteurs activateurs, inhibant

ainsi les fonctions effectrices des cellules NK (**Figure 26**) [380].

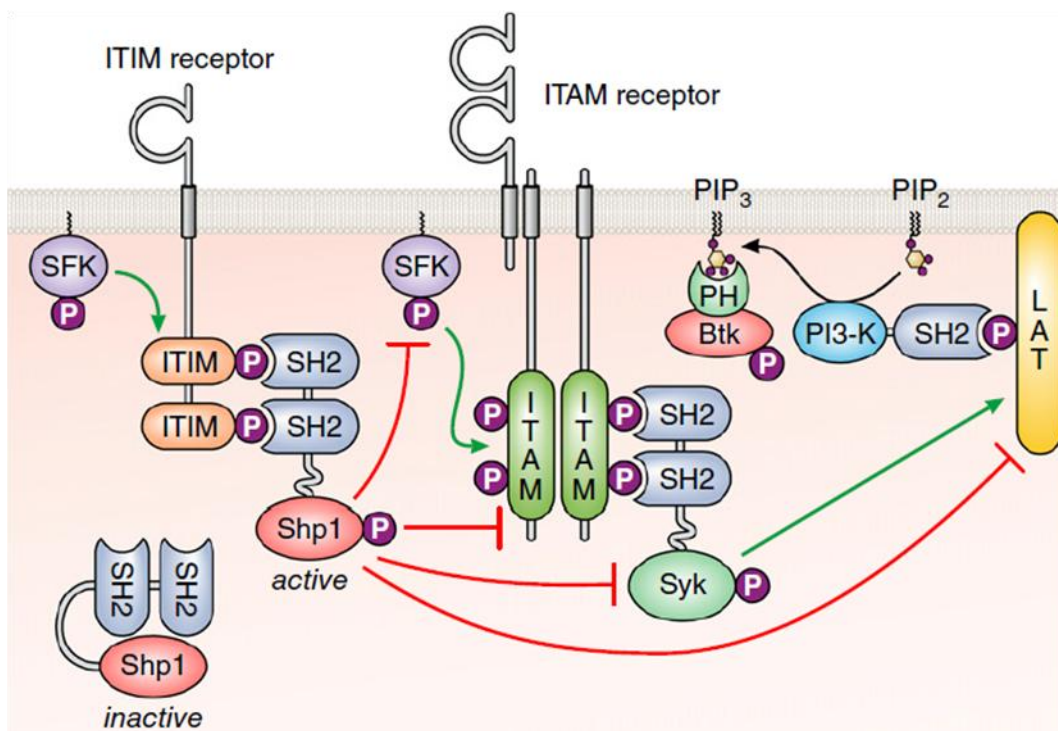


Figure 26 : Signalisation inhibitrice médiée par les motifs ITIM. Les motifs ITIM permettent le recrutement de phosphatases qui inhibent la signalisation induite par les motifs ITAM à de multiples niveaux (traits rouges). SFK : Kinases de la famille Src. Adapté de [381].

4. Fonctions effectrices des cellules NK

Les cellules NK ont deux grandes fonctions : une fonction cytotoxique contre les cellules infectées/transformées et une fonction sécrétrice de cytokines, chimiokines et facteurs de croissance. Ces mécanismes effecteurs sont les mêmes que ceux des LT CD8. La mise en place de ces fonctions nécessite l'engagement de la bonne combinaison de récepteurs pour permettre la mise en place d'une synapse immunologique entre la cellule NK et la cellule cible.

a. Mise en place de la synapse immunologique

La synapse immunologique est une structure dynamique qui permet la reconnaissance, par les cellules NK, de cellules cibles potentielles. La mise en place de cette synapse se déroule en plusieurs étapes. Elle commence par une étape d'initiation où la cellule NK entre en contact avec la cellule cible [382]. S'en suit une étape effectrice, où les granules lytiques sont transportés à la zone de contact et libérés. Enfin, dans une dernière étape, la cellule NK rompt le contact et se sépare de la cellule cible (**Figure 27**).

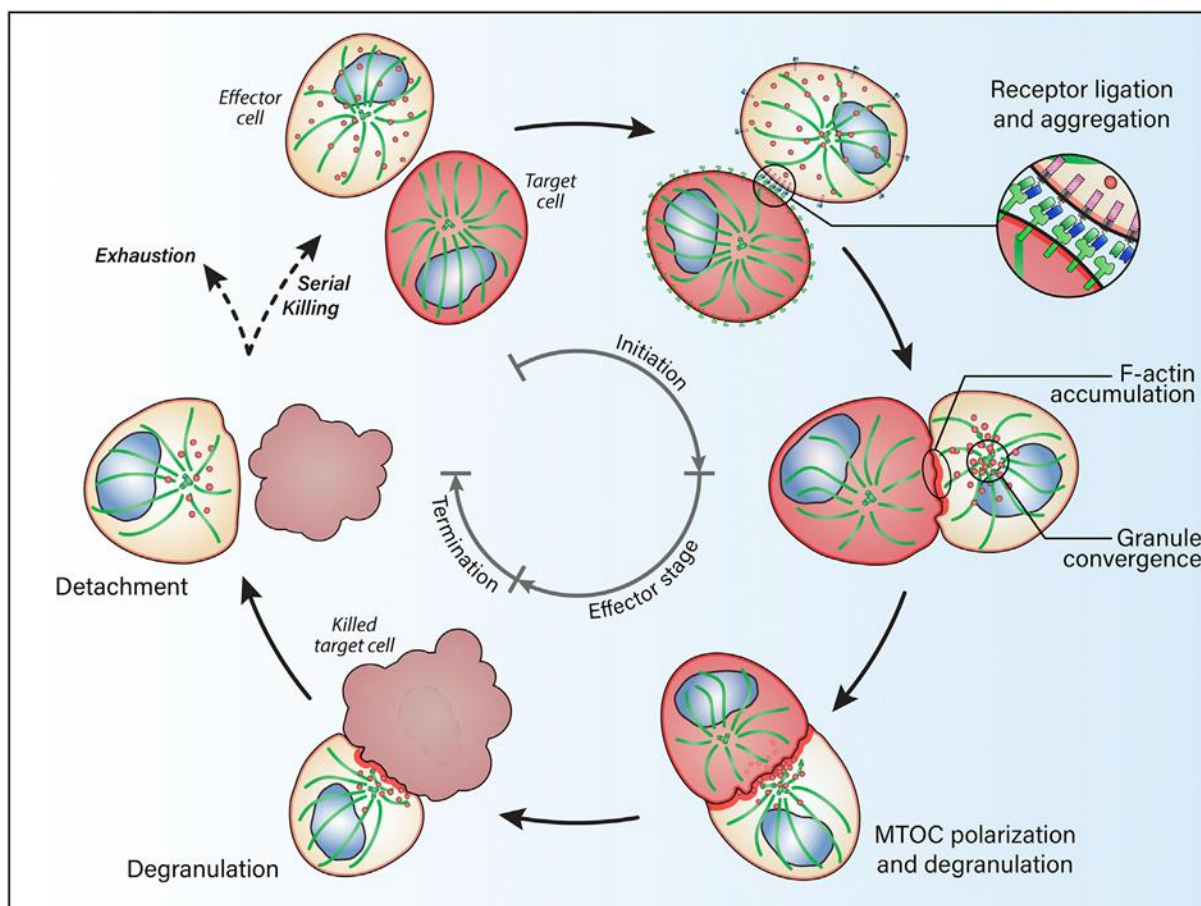


Figure 27 : Mise en place de la synapse immunologique. [383].

Durant la phase d'initiation, la cellule NK entre en contact avec la cellule cible *via* un récepteur activateur. Cette étape permet à la cellule NK de se lier à la cellule cible en utilisant des molécules d'adhésion comme l'intégrine LFA-1 (Leukocyte Function-associated Antigen-1) qui interagit avec les molécules ICAM-1 ou ICAM-2 (Intercellular Adhesion Molecule-1 et -2). Les intégrines forment alors des clusters au niveau de la zone de contact pour augmenter l'adhésion à la cible et renforcer les signaux activateurs [384-386]. Cette étape d'adhésion est essentielle à la signalisation par les récepteurs activateurs, qui est indispensable au déclenchement des fonctions effectrices des cellules NK [387,388].

En l'absence de signaux inhibiteurs, la synapse immunologique commence à s'organiser. Les récepteurs activateurs engagés se clusterisent et un anneau de F-actine se forme autour pour amplifier le signal. Cette étape est responsable de la formation d'un complexe moléculaire de signalisation nommé SMAC [389,390]. La cellule NK réorganise alors son réseau de microtubules et oriente son MTOC (Centre Organisateur des Microtubules) vers la synapse [391,392]. Les granules lytiques contenant les facteurs solubles seront ensuite acheminés au niveau de la synapse par le réseau de microtubules. Elles sont ensuite libérées dans le milieu après un désassemblage local du réseau de F-actine et la fusion des

vésicules à la membrane plasmique grâce aux protéines Rab27a et hMunc13-4 [393].

La dégranulation des cellules NK s'accompagne de l'apparition à la membrane plasmique de la protéine lysosomale CD107a (LAMP-1 ou Lysosome-Associated Membrane Protein-1). Cette expression de CD107a permet également de protéger les cellules NK contre les effets néfastes de la dégranulation [394]. De plus, CD107a peut servir de marqueur pour évaluer l'activité cytotoxique des cellules NK [395]. Après la libération des molécules effectrices, la cellule NK rompt le contact avec la cellule cible et renouvelle ses granules lytiques.

b. Fonction cytotoxique médiée par les granules lytiques

Les granules lytiques sont des lysosomes sécrétoires dans lesquels sont stockés de grandes quantités de molécules cytotoxiques [396]. L'exocytose de ces granules est le mécanisme lytique principal des cellules cytotoxiques et se déroule lors de la reconnaissance du « soi manquant », du « soi altéré », ou de cellules opsonisées (**Figure 28**). Parmi les molécules spécifiques des granules lytiques, on trouve notamment la perforine, les granzymes (majoritairement A et B), la granulysine et les ligands des récepteurs à domaine de mort [397]. A cause du pH acide des lysosomes, ces enzymes sont inactives jusqu'à leur libération à la synapse immunologique.

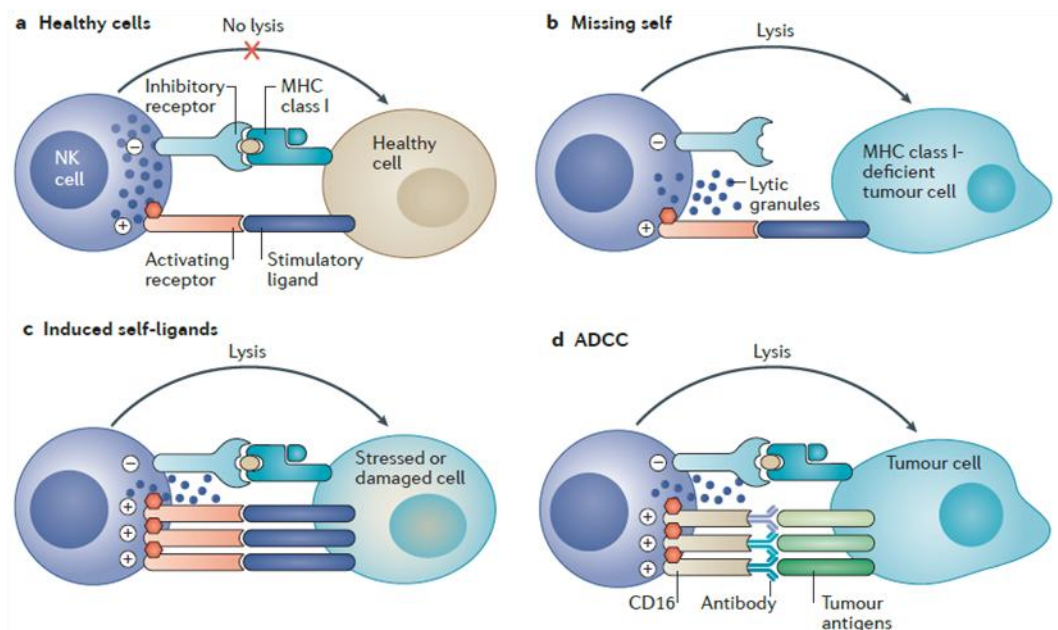


Figure 28 : Signaux régulant la fonction cytotoxique des cellules NK. [398].

La perforine est une protéine capable de former des pores qui permettent l'entrée des molécules lytiques dans le cytosol de la cellule cible [399]. Elle est constitutivement produite par les cellules NK et stockée dans les granules lytiques [400]. Lors de l'activation des cellules NK, la perforine va dans un premier temps former des pores temporaires qui permettent la libération des molécules lytiques et leur accumulation dans des endosomes,

nommés gigantosomes, au niveau de la membrane plasmique de la cellule cible [401]. La perforine va ensuite former de nouveaux pores dans la membrane des gigantosomes, permettant alors la libération des molécules lytiques dans le cytosol de la cellule cible.

Les granzymes sont des sérines protéases exprimés constitutivement par les lymphocytes cytotoxiques (NK et LT CD8). Il existe cinq granzymes différents chez l'Homme (GzmA, GzmB, GzmH, GzmK et GzmM) mais les cellules NK expriment majoritairement le GzmA et le GzmB. Ils diffèrent les uns des autres par la nature de leurs substrats mais induisent généralement la mort cellulaire par des mécanismes communs. De plus, les granzymes sont dépendants de la perforine pour exercer leurs fonctions [402].

Le GzmA est une enzyme avec une activité tryptase qui induit une perte du potentiel transmembranaire des mitochondries et cause des dommages à l'ADN qui induisent la fragmentation nucléaire [403,404]. De plus, il favorise la mise en place d'un microenvironnement pro-inflammatoire en clivant le pro-peptide de l'IL-1 β [405]. La perte du potentiel de la mitochondrie se fait *via* le clivage de la protéine NDUFS3 (NADH Dehydrogenase [Ubiquinone] Iron-Sulfur protein 3) qui augmente la production de ROS [406,407]. Ces ROS participeront à l'induction des dommages à l'ADN et à la mort de la cellule par apoptose.

De manière similaire au GzmA, le GzmB induit l'apoptose de la cellule cible en augmentant la dépolarisation de la membrane mitochondriale et en favorisant la production de ROS [408]. En plus de ce mécanisme, il peut également induire l'apoptose par une autre voie dépendante des caspases (**Figure 29**). Ainsi, le GzmB permet le clivage et l'activation des caspases 3, 7, 8 et 10 qui vont ensuite dégrader le cytosquelette cellulaire, causer une fragmentation de l'ADN et endommager les mitochondries [409]. La GzmB et la caspase 8 vont activer le facteur BID (BH3-Interacting Domain death agonist) qui va détruire l'intégrité mitochondriale et induire la libération de facteurs pro-apoptotiques tels que le cytochrome C et l'endonucléase G mais également de la protéase HtrA2 qui bloque des inhibiteurs d'apoptose [410,411]. La libération de cytochrome C va induire le clivage et donc l'activation des caspases 3 et 9 qui vont alors orchestrer l'apoptose de la cellule cible.

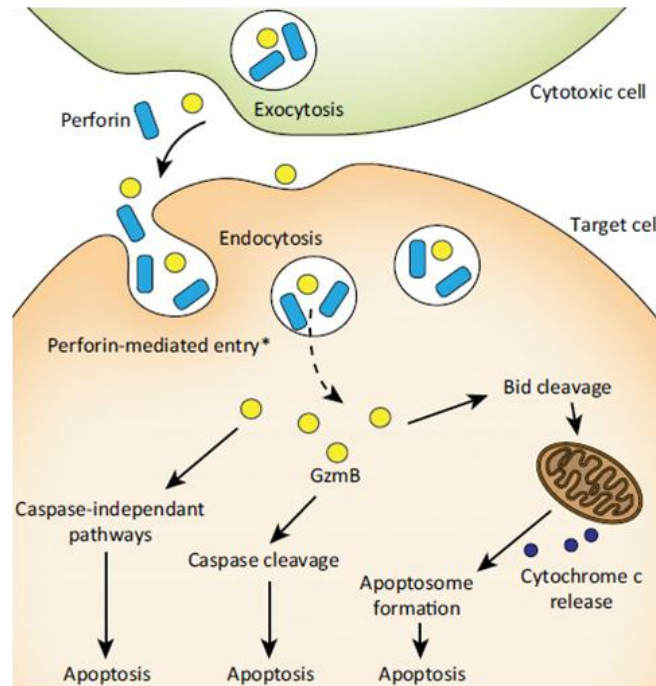


Figure 29 : Mécanismes d'apoptose déclenchés par le granzyme B. [412].

La granulysine est une protéine pro-inflammatoire de la famille des saponines exprimée spécifiquement chez l'Homme [413-415]. Lorsqu'elle rentre dans la cellule cible, la granulysine cause une augmentation du calcium et une diminution du potassium cytoplasmique [416]. Ces modifications vont conduire à des dommages mitochondriaux, caractérisés par la libération de cytochrome C et associés à l'activation des caspases [417]. Même si le mécanisme n'est pas encore bien défini, la granulysine peut également induire la mort cellulaire en activant des sphingomyélinases membranaires [418].

c. Cytotoxicité médiée par les récepteurs à domaine de mort

En plus de la libération des granules lytiques, les cellules NK peuvent tuer leurs cibles cellulaires en exprimant des ligands nécessaires à l'engagement de récepteurs à domaine de mort cellulaire. Les ligands FasL et TRAIL sont des molécules pro-apoptotiques localisées constitutivement dans les granules lytiques des cellules NK matures [419]. En plus de ces ligands, les cellules NK produisent également du $\text{TNF-}\alpha$, une cytokine pro-inflammatoire qui induira également la mort cellulaire par des mécanismes similaires. Ainsi, la triple expression de FasL, TRAIL et $\text{TNF-}\alpha$ caractérise les cellules NK complètement matures avec une capacité cytotoxique optimale [196].

FasL (CD95L) et TRAIL (CD253) ont des mécanismes d'action similaires (**Figure 30**). Ils sont localisés dans les granules lytiques et se retrouvent exposés à la surface des cellules NK au moment de leur dégranulation. Ils vont ensuite former des multimères dans les radeaux lipidiques et modifier leur domaine intracellulaire [420]. Cette modification permet le

recrutement de FADD (Fas-Associated protein with Death Domain) et de la pro-caspase 8, qui permettent la formation d'un complexe de signalisation DISC (Death-Inducing Signaling Complex) [421,422]. Au sein du complexe DISC, la pro-caspase 8 est clivée, devient active et peut alors :

- Induire directement l'apoptose des cellules cibles en activant les caspases 3, 6 et 7,
- Cliver la protéine BID qui induira des dommages aux mitochondries et stimulera la libération du cytochrome C qui déclenchera l'apoptose en activant la caspase 9 [423,424].

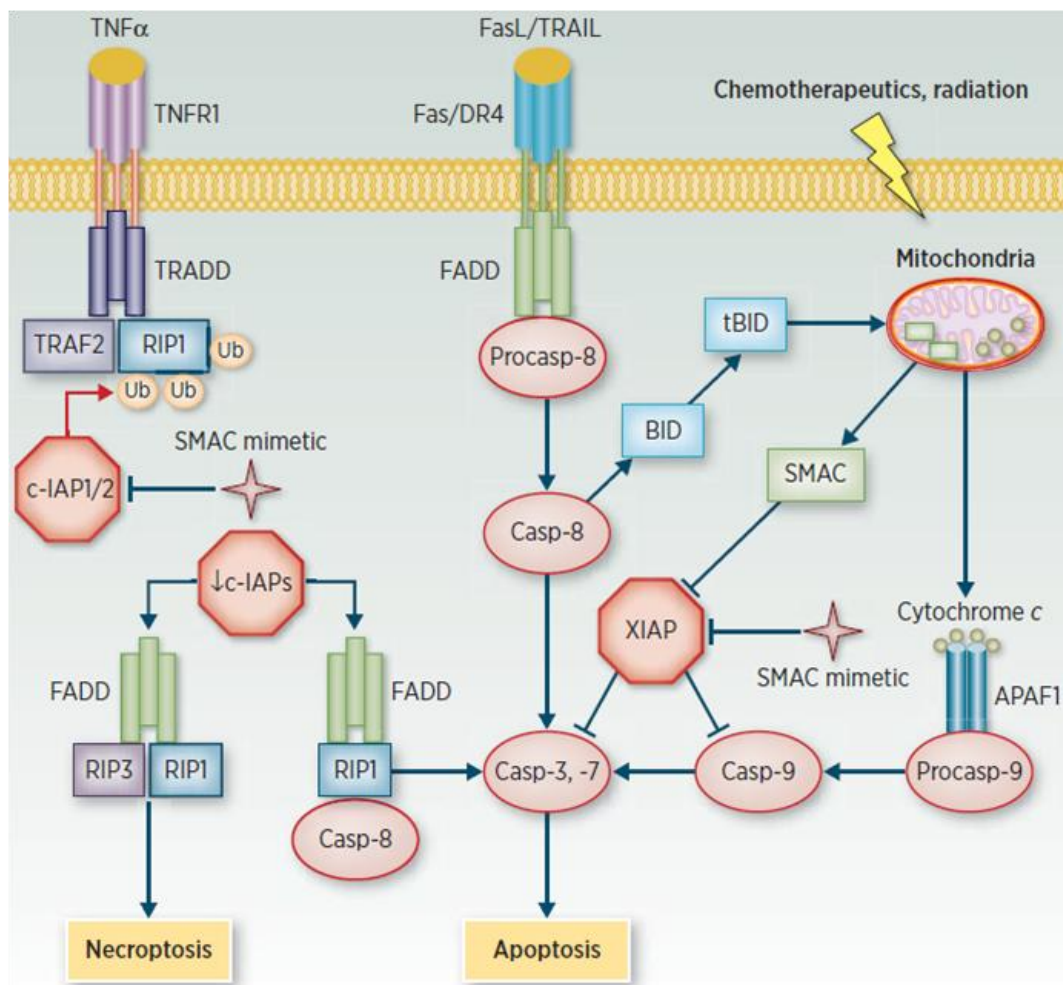


Figure 30 : Signalisation déclenchée par les récepteurs à domaine de mort. [425].

Les voies pro-apoptotiques induites après engagement des récepteurs Fas ou TRAIL-R peuvent être inhibées par l'expression du facteur XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein) qui a des fonctions anti-apoptotique (**Figure 30**) [426,427].

TNFR1 est le récepteur du TNF- α , une des principales cytokines sécrétées par les cellules NK. Ce récepteur a deux fonctions principales :

- Premièrement, il peut être recruté au niveau des radeaux lipidiques, déclencher une

réponse pro-inflammatoire et induire l'activation cellulaire en activant NF- κ B et les Janus Kinases [428].

- Deuxièmement, il peut être internalisé et former un complexe de signalisation DISC [429]. Il permettra alors l'activation de la caspase 8 qui aura un effet pro-apoptotique *via* la voie des caspases et la voie mitochondriale (**Figure 30**). De plus, le TNFR1 internalisé peut également, *via* FADD, déclencher la nécroptose (nécrose programmée) de la cellule cible [430].

d. Fonction sécrétrice des cellules NK

Les cytokines sont des glycoprotéines sécrétées lors de l'exocytose de vésicules de sécrétion après fusion entre la membrane de lysosomes et la membrane plasmique. Elles se lient à leur récepteur spécifique et peuvent avoir un effet autocrine, juxtacrine, paracrine et endocrine. Elles ont ensuite des effets multiples et régulent de nombreuses fonctions cellulaires telles que la transcription, la traduction, la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire. De plus, les cellules NK peuvent moduler leur sécrétion de cytokines en fonction du contexte d'activation [431].

Lors de la reconnaissance de cellules infectées ou transformées, la sécrétion d'IFN- γ et de TNF- α par les cellules NK permet l'activation et la maturation des DC [432,433]. De plus, après contact avec les cellules NK activées, les DC matures augmentent leur expression de la molécule de costimulation CD86 et sécrètent de l'IL-12, pour activer et polariser les LT [434]. Cette interaction NK-DC permet ainsi l'activation des LT CD8 sans l'aide des LT CD4 [435]. En retour, les DC activent les cellules NK en trans-présentant l'IL-15 [241]. En parallèle, les cellules NK peuvent directement participer à la mise en place des réponses Th1 en se localisant à proximité des LTCD4 dans les nœuds lymphatiques et en sécrétant de grandes quantités d'IFN- γ [436,437]. L'IFN- γ produit par les cellules NK favorise également l'activation et la polarisation des macrophages [438]. Enfin, les cellules NK sont capables de sécréter de nombreuses autres cytokines telles que le GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor), l'IL-6, l'IL-10 ou encore l'IL-17 [439,440].

En plus des cytokines, les cellules NK sécrètent des molécules chimio-attractantes nommées chimiokines [441,442]. Elles produisent notamment du CCL-2 (MCP-1), CCL-3 (MIP-1 α), CCL-4 (MIP-1 β), CCL-5 (RANTES), CXCL-8 (IL-8) et CXCL-10 (IP-10) [276,443].

e. Fonction adaptative des cellules NK

A la différence des LT et des LB, les cellules NK n'ont pas de récepteur unique doté d'une grande diversité et spécialisé dans la reconnaissance antigénique. Ainsi, les cellules NK ont longtemps été considérées comme des cellules de l'immunité innée qui tuent leurs cibles

sans expansion clonale ni mémoire antigénique durable. Cependant, de plus en plus d'études remettent en question cette notion en attribuant des fonctions adaptatives aux cellules NK, contredisant ainsi leur appartenance stricte à l'immunité innée.

La première preuve de l'existence des fonctions adaptatives des cellules NK a été révélée dans un modèle de souris RAG2^{-/-} (sans LT ni LB) [444]. En utilisant un modèle d'hypersensibilité aux haptènes, les auteurs ont découvert une population de cellules NK « mémoires » qui est résidente du foie, spécifique des haptènes et qui persiste au cours du temps. De plus, le transfert spécifique de cette population dans des souris non immunisées permet une réponse plus importante après restimulation.

La réponse mémoire des cellules NK a ensuite été étudiée dans un modèle murin d'infection virale par le CMV (MCMV), dans lequel le récepteur Ly49H est essentiel au contrôle de l'infection [445,446]. Il a alors été montré que, durant l'infection par le MCMV, les cellules NK Ly49H⁺ prolifèrent de manière spécifique et clonale dans la rate et le foie [172]. De plus, elles confèrent une protection efficace contre le virus, persistent durablement et répondent plus efficacement après restimulation. Enfin, le transfert adoptif de ces cellules permet de transférer la protection contre le MCMV. Ainsi, les cellules NK mémoires résument l'ensemble des propriétés des cellules mémoires classiques (LT/LB). Une population de cellules NK mémoires a également été caractérisée chez le primate dans un modèle d'infection par le VIH [447].

Chez l'Homme, une population de cellules NK mémoires spécifique au HCMV a également été identifiée. Cette population, qui exprime fortement le récepteur activateur NKG2C, est amplifiée de manière préférentielle durant l'infection par le HCMV et participe au contrôle de l'infection [448,449]. En plus des cellules mémoires « antigènes-spécifiques », il a été montré chez la souris et chez l'Homme qu'un microenvironnement riche en IL-12, IL-15 et IL-18 permet la différenciation des cellules NK en cellules « mémoire-like » [450,451]. De plus, ces cellules ont une forte réponse effectrice contre des cellules tumorales [452].

5. Cellules NK et réponse anti-tumorale

Les cellules NK ont été définies et nommées en fonction de leur capacité à tuer les cellules tumorales *in vitro* sans nécessiter de stimulation préalable [177,178]. Cette activité anti-tumorale a également été confirmée *in vivo* en inactivant ou déplétant les cellules NK [453,454]. Les cellules tumorales sont préférentiellement ciblées par les cellules NK car elles diminuent ou perdent l'expression des molécules HLA-I (pour échapper à la lyse par les LT CD8), et expriment de nombreuses molécules du « soi altéré ». Chez l'Homme, le nombre de cellules NK infiltrant les tumeurs a été associé à un bon pronostic et une évolution

favorable de plusieurs types de cancers [455].

L'activation des cellules NK par les cellules tumorales nécessite différents récepteurs activateurs. Parmi ces récepteurs, NKG2D joue un rôle essentiel dans la surveillance anti-tumorale car ses ligands MICA, MICB et les ULBP sont souvent surexprimés par les tumeurs. Ainsi, les souris déficientes pour NKG2D sont plus susceptibles au développement spontané de tumeurs [456]. De plus, le polymorphisme de NKG2D est étroitement lié à l'activité cytotoxique des cellules NK et au risque de développer des cancers [457,458].

Les NCR jouent également un rôle essentiel dans l'immunosurveillance des tumeurs. L'importance des NCR dans l'immunité anti-tumorale a été révélée par des études montrant une corrélation entre l'expression des NCR et la capacité des cellules NK à lyser les cellules tumorales [275,459,460]. De plus, chez la souris, la déficience en NKp46 a été associée à un développement tumoral accru [461,462]. Concernant NKp44, il a été montré que son ligand PCNA est exprimé à la surface de cellules tumorales et entraîne l'inhibition des cellules NK en se liant à une isoforme inhibitrice du récepteur activateur [288]. Cette inhibition est réversible en utilisant des peptides dérivés de NKp44 [463]. Les cellules tumorales surexpriment également B7-H6, un ligand activateur de NKp30 [296]. De plus, l'expression de l'isoforme inhibitrice NKp30c est associée à un mauvais pronostic dans des cas de cancers pancréatiques [281]. Enfin, il semblerait que les cellules NK non éduquées (n'ayant pas de récepteurs inhibiteurs au CMH-I du Soi) soient toujours capables lyser des cellules transformées, faisant d'elles des effecteurs clé de l'immunité anti-tumorale [464].

Du fait de leur rôle central dans l'immunosurveillance tumorale, cibler cellules NK est un choix pertinent pour le développement de nouvelles stratégies anti-tumorales. Une de ces stratégies consiste à activer les cellules NK des patients en utilisant des cytokines immunostimulatrices telles que l'IL-2 ou l'IL-15 [465,466]. D'autres thérapies sont basées sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes tumoraux pour activer l'ADCC [467,468].

Afin de se protéger des cellules NK, les tumeurs mettent en place différents mécanismes d'échappement. Elles peuvent notamment exprimer la protéine CEACAM1 qui diminue l'expression des ligands de NKG2D à la surface cellulaire [469]. De plus, l'expression de HLA-E, ligand du récepteur inhibiteur NKG2A, est associée à un mauvais pronostic dans les cancers colorectaux [470]. Enfin, les cellules tumorales favorisent la création d'un microenvironnement immunosuppresseur enrichi en IL-10, TGF- β et IDO [471-473]. Elles sécrètent également la forme soluble de ligands des NKR qui vont bloquer la reconnaissance des cellules tumorales et limiter l'activation des cellules NK [474,475].

6. Cellules NK et transplantation

Les cellules NK sont des acteurs essentiels de l'immunité dirigée contre les allogreffes. Elles interviennent dans le rejet aigu et chronique, et peuvent avoir des effets bénéfiques ou délétères.

Les cellules NK peuvent être activées directement par la reconnaissance des cellules du greffon, notamment si il y a un mésappariement entre les haplotypes KIR/HLA [476]. De plus, les cellules du greffon expriment des ligands de stress qui peuvent activer les cellules NK du receveur *via* NKG2D et participer au rejet aigu [477]. Enfin, après activation, les cellules NK sécrètent de l'IFN- γ , du TNF- α et des chimiokines qui augmentent l'infiltration de cellules immunes, potentialisent la maturation des CPA et favorisent la mise en place d'une réponse adaptative de type Th1 dirigée contre le greffon [478,479]. Les cellules NK peuvent également contribuer au rejet de la greffe *via* l'ADCC [480].

A l'inverse, les cellules NK peuvent également avoir des effets bénéfiques et favoriser la tolérance envers le greffon. Ainsi, dans un microenvironnement pro-inflammatoire, les cellules NK sont capables de sécréter de l'IL-10 [481,482]. Cette IL-10, de par son action anti-inflammatoire, favorisera la tolérance du greffon et le développement de LTreg. De plus, il a été montré que les cellules NK sont capables de tuer les CPA du donneur, ce qui permet de limiter la mise en place d'une réponse adaptative délétère [483,484]. Ce phénomène conduit à un biais du microenvironnement Th1 néfaste vers un profil Th2 bénéfique.

Enfin, les incompatibilités KIR/HLA peuvent également avoir un effet bénéfique dans un contexte tumoral *via* un effet nommé « greffe versus leucémie » (GvL, Graft versus Leukemia). Il a ainsi été montré que, lors d'une greffe de cellules souches, les cellules NK du donneur sont alloréactives et permettent l'élimination de cellules tumorales chez le receveur [485]. De plus, ces cellules NK alloréactives protègent contre la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD, Graft versus Host Disease) et favorisent la prise de greffe [485,486].

7. Cellules NK et infections virales

Le rôle central des cellules NK dans le contrôle aux virus a été révélé dans des rares cas de patients n'ayant pas de cellules NK, et qui sont plus susceptibles aux infections virales et développent des pathologies plus sévères [487,488]. Parmi les virus efficacement contrôlés par les cellules NK, on trouve notamment les virus de la famille des herpes (HCMV, EBV, HSV, ...), le VIH-1, le VHC et le virus de l'influenza. Les cellules infectées et les CPA proches sécrètent des cytokines telles que l'IFN- α , l'IFN- β , l'IL-12, l'IL-15 et l'IL-18 qui participent à l'activation des cellules NK [489]. Les cellules NK vont alors sécréter des cytokines telles que l'IFN- γ et le TNF- α qui participeront au contrôle de la réplication virale et

activeront les effecteurs de l'immunité adaptative (LT CD4, LT CD8, ...) [490].

- HCMV

L'infection par le HCMV est majoritairement asymptomatique. Cependant, le virus peut établir une infection latente et se réactiver chez des patients immunodéprimés, causant alors des pathologies sévères. L'infection par le HCMV affecte le phénotype des cellules NK. En effet, il a été montré que une population de cellules NKG2C⁺ est amplifiée en réponse au HCMV et peut représenter jusqu'à 25% des cellules NK [491,492]. De plus cette population est capable de répondre en cas de réactivation du HCMV chez des patients immunodéprimés et de sécréter des cytokines pro-inflammatoires [493]. Il semble également que le génotype des KIR soit également important dans le contrôle de la réactivation du HCMV [494,495]. Cette population de cellules NK NKG2C⁺ est également caractérisée par une forte expression de CD57, une augmentation de l'expression de KIR activateurs (KIR2DS2, KIR2DS4 et KIR3DS1), et une diminution de l'expression des récepteurs NKG2A, KIR3DL1, NKp30 et NKp46 [449,491,496]. Enfin, la réponse des cellules NK est spécifique au virus mais également au type cellulaire infecté. Ainsi, alors que le récepteur majoritairement impliqué dans la lyse de fibroblastes infectés est NKG2D, le contrôle de l'infection dans les DC nécessite les récepteurs NKp46 et DNAM-1 [497].

- EBV

Le virus d'Epstein Barr (EBV) est un herpèsvirus qui établit une infection latente chez 95% des personnes dans le monde. Il est majoritairement asymptomatique mais peut être associé au développement de mononucléoses ou de lymphomes B. Il a été montré que le nombre et la fréquence de cellules NK est augmenté dans le sang de patients durant la phase symptomatique de l'infection [498]. De plus, il a été montré que l'infection par l'EBV est associée au développement de tumeurs chez des patients dépourvus de cellules NK [499]. Enfin, l'infection par EBV rend les LB plus sensibles à la lyse par les cellules NK. En parallèle, la production d'IFN- γ par les cellules NK boque la transformation tumorale des LB infectés [500]. La susceptibilité accrue des LB à la lyse par les cellules NK s'explique par une diminution des molécules de HLA-I associée à une augmentation de ligands de NKR activateurs [501].

- VIH-1

Le VIH-1 est le virus responsable de l'épidémie du Syndrome de l'Immunodéficience Acquise (SIDA), qui représente un problème de santé publique majeur depuis son apparition dans les années 1980. Il infecte divers types cellulaires dont les LT CD4, les macrophages et les DC en utilisant le CD4 comme récepteur d'entrée, et CCR5 ou CXCR4 comme co-récepteur

[502]. La caractéristique principale de cette maladie est la déplétion massive du pool de LT CD4 dans les tissus et en périphérie. Cette déplétion fait intervenir les LT cytotoxiques mais également les cellules NK. Chez les personnes infectées, le polymorphisme KIR/HLA-I est impliqué dans le contrôle de la virémie [503]. Ainsi, les patients qui co-expriment HLA-Bw4 et les KIR3DS1/KIR3DL1 progressent plus lentement vers le stade SIDA [504,505]. Au contraire, il a été montré qu'une forte expression de HLA-A augmente l'inhibition des cellules NK médiée par NKG2A, ce qui limite également le contrôle de l'infection [506]. En parallèle, l'infection par le VIH-1 altère la distribution et les fonctions des sous-populations de cellules pNK. Le ratio $CD56^{\text{bright}}/CD56^{\text{dim}}$ augmente et une population de cellules NK $CD56^{\text{neg}}$ hyporépondueuse s'accumule durant la phase aiguë et chronique de l'infection [507-509]. La perte de fonctionnalité des cellules NK est le résultat d'une diminution de l'expression des KIR activateurs et des NCR, et d'une augmentation de l'expression des KIR inhibiteurs, associés à une diminution de la sécrétion d'IFN- γ , de TNF- α et de GM-CSF [510-512]. Enfin, les cellules NK participent directement à la lyse des LT CD4 infectés *via* la reconnaissance de la protéine gp41 du VIH-1 par le récepteur activateur NKp44 [513].

- VHC

Le VHC est un virus à ARN simple brin enveloppé de la famille des *Flaviviridae* qui infecte les hépatocytes, et est responsable de cirrhoses hépatiques et des carcinomes hépatocellulaires. Les cellules de l'immunité innée et plus particulièrement les cellules NK jouent un rôle clé dans l'élimination du virus. En temps normal, les cellules NK représentent 30% des lymphocytes du foie. Ce nombre augmente en cas d'infection par le VHC et peut atteindre les 90% [514]. Elles vont alors lyser les cellules infectées et produire de l'IFN- γ . L'IFN- γ sécrété par les cellules NK inhibe la réplication virale et semble plus bénéfique que la réponse cytotoxique, qui est en partie responsable de dommages hépatiques. Des associations KIR/HLA ont été corrélées avec une résistance à l'infection par le HCV. Ainsi, le KIR2DL3 semble avoir un effet protecteur alors que le KIR2DL5 est associé à un échec de thérapies anti-VHC [515,516]. Comme pour le VIH, les cellules NK des patients ont une altération du ratio $CD56^{\text{bright}}/CD56^{\text{dim}}$ associée à l'émergence de cellules NK $CD56^{\text{neg}}$ [517]. De plus, l'infection chronique par le VHC est associée à une forte expression hépatique de HLA-E, corrélée à l'augmentation de l'expression de NKG2A par les cellules NK [518]. L'association entre HLA-E et NKG2A permet alors d'inhiber les fonctions effectrices des cellules NK, ce qui pourrait expliquer la progression de l'infection vers la chronicité. Enfin, les populations de cellules NK exprimant NKp46 et NKp30 diminuent dans le sang, ce qui suggère leur recrutement au niveau du foie pour lutter contre l'infection [519-521].

- Virus de l'influenza

Le virus de l'influenza est un virus à ARN simple brin enveloppé de la famille des *Orthomyxoviridae* qui est responsable d'épidémies annuelles. La protection vaccinale contre ce virus est basée sur la production d'anticorps neutralisants et sur la réponse LT CD8 cytotoxique [522]. Les cellules NK participent également au contrôle viral. Ce rôle a été mis en évidence dans un modèle murin où la déplétion des cellules NK augmente la létalité du virus de l'influenza [523]. Cette protection par les cellules NK pourrait passer par la reconnaissance des hémagglutinines virales par NKp46 et/ou par la lyse des cellules infectées par ADCC [292,524]. Chez l'Homme, la réponse au virus de l'influenza utilise majoritairement les récepteurs NKp46 et NKG2D [525]. Les DC infectées augmentent leur expression des ligands de ces récepteurs et sécrètent de grandes quantités d'IFN- α et d'IL-12, ce qui active les cellules NK. Le virus de l'influenza peut cependant échapper à la réponse des cellules NK en modifiant le profil de glycosylation des hémagglutinines, ce qui empêche leur reconnaissance par NKp46 [526].

- Autres infections

En plus de leurs nombreux rôles durant les infections virales, les cellules NK participent également au contrôle des infections bactériennes, parasitaires et fongiques.

Il a été montré le récepteur NKp44 est capable d'interagir des composants de la paroi de plusieurs bactéries dont la souche vaccinale atténuée du BCG (Bacille de Calmette-Guérin, vaccin contre la tuberculose) et d'induire l'activation des cellules NK [527]. Cette reconnaissance bactérienne nécessite également le TLR2, et induit la lyse des cellules dendritiques infectées et la sécrétion d'IFN- γ et de TNF- α par les cellules NK [528]. De plus, la reconnaissance de bactéries par les différents PRR de cellules accessoires (DC, macrophages, ...) induit une sécrétion d'IFN de type I, d'IL-12, d'IL-15 et d'IL-18 qui vont permettre une activation indirecte des cellules NK, qui vont à leur tour polariser la réponse des LT vers un profil Th1 [529-531]. Enfin, une étude a prouvé que la granulysine rompt préférentiellement la paroi bactérienne et favorise l'entrée et l'action des granzymes qui tuent les bactéries en causant une accumulation de ROS [532].

Concernant la fonction antiparasitaire, il a été montré que la déplétion des cellules NK est associée à une sévérité accrue de l'infection par *Leishmania major* [533,534]. Au contraire, dans les souris SCID (qui n'ont ni LT, ni LB), les cellules NK sont suffisantes pour empêcher la dissémination du parasite [535]. De plus, il semblerait que le contrôle de l'infection soit dû à la production de cytokines (notamment l'IFN- γ), plutôt qu'à la fonction cytotoxique [534,536]. Le rôle des cellules NK a également été étudié lors de l'infection par *Plasmodium falciparum*, le parasite responsable du paludisme. Il a été observé que les cellules NK sont

capables de produire de grandes quantités d'IFN- γ au contact d'érythrocytes infectés, et cela de manière IL-12 et IL-18 dépendante [537-539]. Elles peuvent également tuer les cellules infectées *via* la libération de perforine et GzmB [540]. Enfin, en utilisant un modèle de souris humanisée, il a été montré que les cellules NK contrôlent la charge parasitaire en lysant les érythrocytes infectés [541].

Il n'existe que peu de données sur le rôle antifongique des cellules NK. Il a cependant été montré qu'elles limitent la croissance fongique soit de manière directe *via* la lyse, soit de manière indirecte *via* la sécrétion de cytokines [542,543]. De plus, dans un modèle d'infection murin par *Aspergillus fumigatus*, les cellules NK sont la source principale d'IFN- γ , qui endommage alors le pathogène et rend les macrophages résistants à l'infection [544,545].

C. Les Macrophages

Les macrophages ont été identifiés par Elie Metchnikoff en 1882 grâce à leur activité de phagocytose. Ce sont des cellules de l'immunité innée qui jouent un rôle central pour la défense de l'hôte et lors de l'inflammation. Ils présentent une grande diversité anatomique et fonctionnelle et sont présents dans l'ensemble des tissus de l'organisme mais aussi dans le sang sous forme de précurseurs (les monocytes). Ces monocytes représentent environ 20% des cellules mononucléées du sang périphérique.

1. Développement et homéostasie des macrophages

La famille des monocytes/macrophages est composée de précurseurs dans la moelle osseuse, de monocytes circulants et de macrophages tissulaires. Les cellules engagées dans ce lignage proviennent de cellules souches hématopoïétiques qui subissent de nombreuses étapes de différenciation (**Figure 31**). Lors de la dernière étape de différenciation, la cellule devient un monocyte capable de quitter la moelle osseuse, de rejoindre la circulation sanguine et de migrer vers les tissus [546].

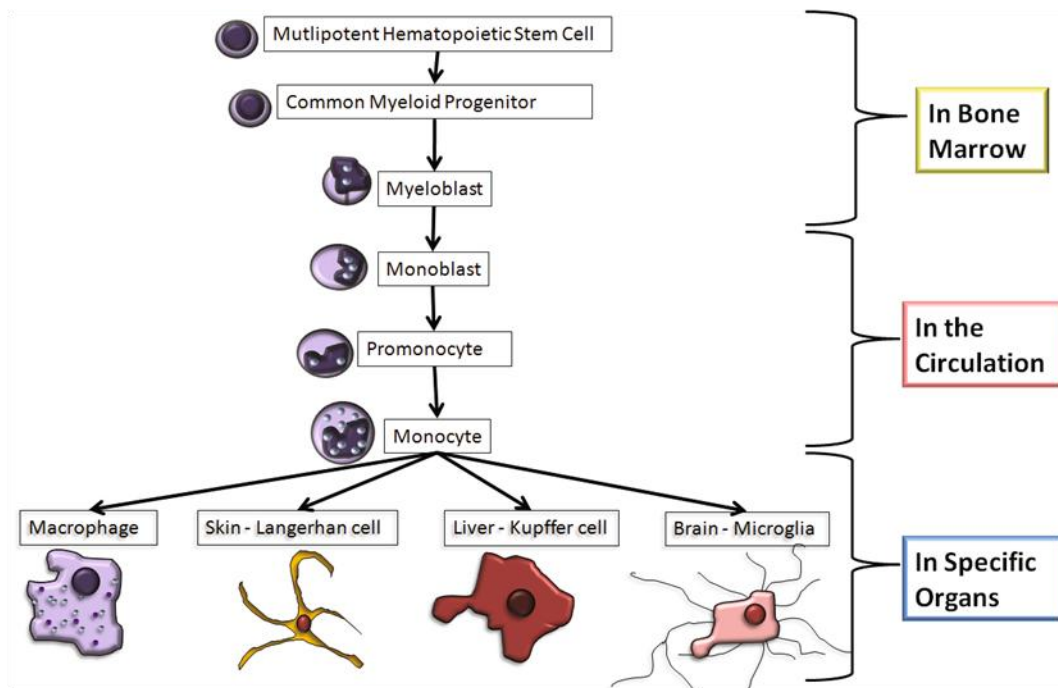


Figure 31 : Développement des macrophages. [547].

Le développement des monocytes/macrophages est sous le contrôle de facteurs de croissance tels que le M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor), le GM-CSF et le FL, qui permettent l'engagement du précurseur myéloïde commun dans le lignage macrophage [548]. Ainsi, la déficience en M-CSF chez la souris *Csf1^{op/op}* a pour conséquence d'altérer le développement et l'homéostasie des macrophages [549]. Au contraire, une injection de M-CSF permet d'augmenter le nombre de monocytes et de macrophages.

a. Monocytes sanguins circulants

Après être sortis de la moelle osseuse, les monocytes parcourent la circulation sanguine pendant plusieurs jours avant de rejoindre les tissus. Ils constituent cependant une population hétérogène qui peut être divisée en trois sous-populations en fonction de leur expression de molécules membranaires CD14 et CD16 [550]. Les monocytes « classiques » sont caractérisés par un phénotype $CD14^{++}CD16^{-}$ et représentent la sous population la plus abondante dans le sang [551]. Tout comme leurs homologues murins $Ly6C^{hi}$, ils expriment le récepteur aux chimiokines CCR2 et sont impliqués dans la réponse inflammatoire [552]. Les monocytes « non-classiques » sont caractérisés par un phénotype $CD14^{+}CD16^{++}$. Cette population exprime le récepteur CX3CR1 et est proche des monocytes murins $Ly6C^{lo}$ qui patrouillent dans la circulation sanguine et répondent rapidement aux menaces [553,554]. Enfin, les monocytes « intermédiaires » sont $CD14^{++}CD16^{+}$ et ont des fonctions pro-inflammatoires [550].

b. Macrophages tissulaires résidents

On retrouve des macrophages dans l'ensemble des tissus de l'organisme, ce qui fait d'eux un des types cellulaires les plus abondant du corps [555]. Ces macrophages résidents présentent une forte hétérogénéité, ont une longue durée de vie et patrouillent dans les tissus à la recherche d'éventuelles menaces (pathogènes ou dommages tissulaires). Les macrophages tissulaires sinusoïdaux, tels que les cellules de Kupffer dans le foie, restent en contact avec le sang. Ces cellules peuvent alors détecter des pathogènes sanguins et participer à la clairance d'érythrocytes et de débris cellulaires [556,557].

Les macrophages sont également essentiels au développement embryonnaire. En effet, les souris déficientes pour le M-CSF présentent un défaut de croissance, un défaut du développement neuronal et pancréatique, une ostéoporose et sont stériles [549,558]. De plus, les macrophages ont des fonctions qui peuvent s'adapter pour devenir spécifiques d'un tissu donné et de son microenvironnement (**Figure 32**). En conséquence, l'ensemble des macrophages s'adapte pour réaliser les fonctions spécifiques des organes dans lesquels ils résident, rendant la comparaison entre eux difficile. Enfin, l'homéostasie tissulaire des macrophages est maintenue par un renouvellement local. En fonction du tissu, les macrophages peuvent proliférer et renouveler leur pool effecteur, notamment sous l'effet du M-CSF [559-562]. Ils peuvent également se renouveler grâce au recrutement tissulaire et à la différenciation de monocytes présents dans la circulation sanguine [563,564].

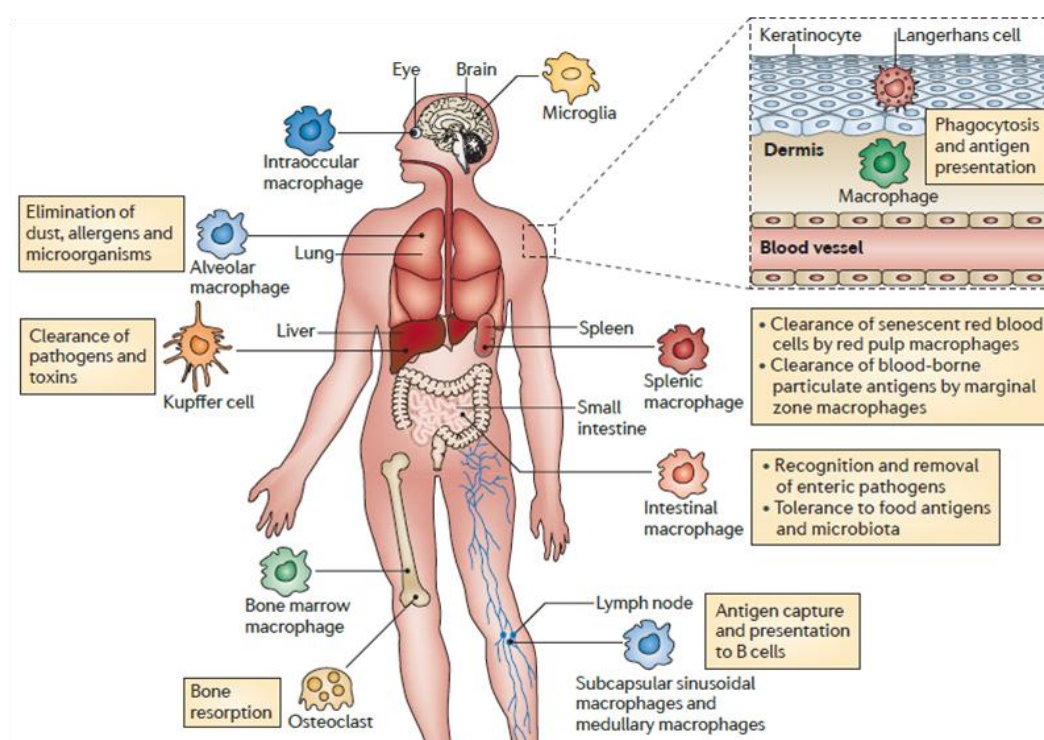


Figure 32 : Distribution et fonctions des macrophages tissulaires. Adapté de [565].

2. Polarisation des macrophages

Indépendamment de leurs origines, les macrophages peuvent répondre aux modifications de leur microenvironnement en s'activant et en modifiant leur polarisation. De manière classique, on distingue deux grandes familles de macrophages : les macrophages de type I (M1) dits « activés classiquement » et les macrophages de type II (M2) dits « activés alternativement » (**Figure 33**) [438,566,567].

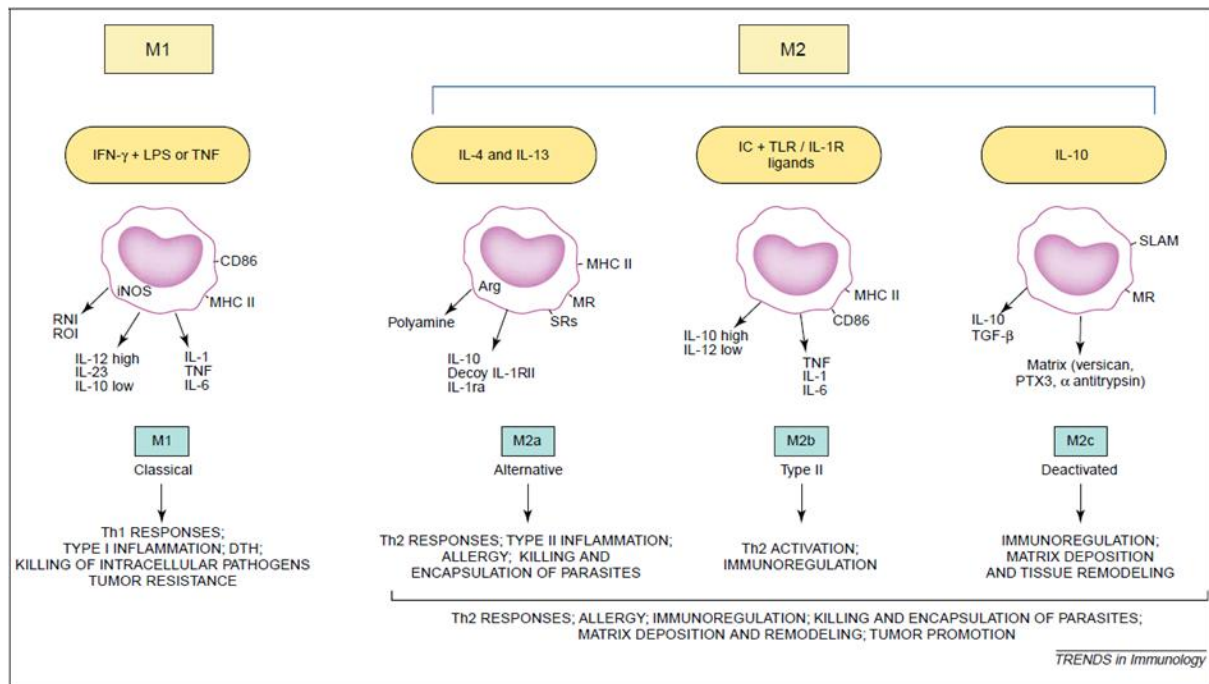


Figure 33 : La polarisation M1/M2 des macrophages. [438]

La différenciation des macrophages en M1 est observée au cours de la réponse inflammatoire. Cette différenciation nécessite de l'IFN- γ (produit par les cellules NK et les LT), seul ou en synergie avec le TNF- α ou des composantes bactériennes [568]. Ces macrophages expriment fortement le CMH-II et la molécule de costimulation CD86. De plus, ils sécrètent des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β et IL-12), présentent des antigènes aux LT et favorisent l'initiation d'une réponse de type Th1 qui est nécessaire à l'élimination des pathogènes ou des cellules tumorales.

A l'opposée des M1, la polarisation M2 dite « alternative » est associée à une activité modulatrice des macrophages. En fonction de la stimulation reçue par les macrophages se polariseront en M2a, M2b ou M2c qui ont des fonctions bien distinctes [438,569,570]. Ces différentes sous-populations de M2 sont caractérisées par des phénotypes différents et par des profils spécifiques de sécrétion cytokinique. Les M2a sont différenciés par l'IL-4 et l'IL-13, les M2b par des complexes immuns et des agonistes des TLR, et les M2c par l'IL-10. Les M2a et M2b ont une fonction immuno-régulatrice et sont impliqués dans les réponses de

type Th2. Les M2c sont impliqués dans la suppression de la réponse immunitaire et dans le remodelage tissulaire.

Enfin, les macrophages sont des cellules dotées d'une grande plasticité [571,572]. Ainsi, leur état de polarisation M1/M2 peut, dans une certaine mesure, être réversée en fonction des modifications du microenvironnement local [573,574].

3. Fonctions des macrophages durant l'inflammation

L'inflammation est un processus finement régulé qui se met en place en réponse à une infection ou à des dommages tissulaires. Elle permet d'éliminer les pathogènes, de réparer les tissus endommagés et de restaurer l'homéostasie tissulaire. Elle est fortement dépendante de l'immunité innée et notamment des macrophages qui sont des acteurs majeurs des différentes phases de l'inflammation (**Figure 34**).

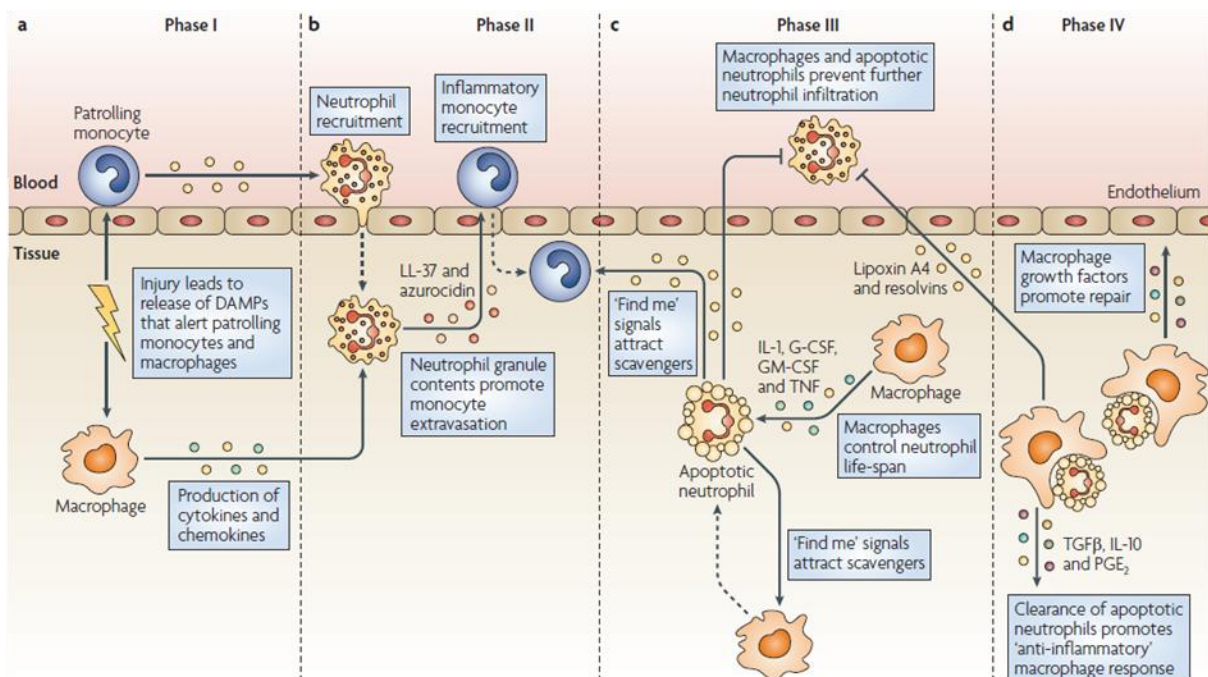


Figure 34 : Rôle des macrophages durant l'inflammation. [575].

a. Phase I : Activation des macrophages résidents

L'initiation de la réponse inflammatoire est un processus finement régulé pour éviter les dommages collatéraux. De par leur localisation, les macrophages résidents tissulaires sont parmi les premières cellules à percevoir le danger et initier la réponse inflammatoire. Les dommages tissulaires (DAMP ou Damage-Associated Molecular Patterns) et les pathogènes (PAMP ou Pathogen-Associated Molecular Patterns) sont détectés par les macrophages *via* leurs PRR, déclenchent l'activation de NF-κB et STAT1 et induisent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires [576]. Les monocytes CD14⁺CD16⁺⁺ qui patrouillent dans la circulation

sanguine peuvent également être recrutés rapidement et aider les macrophages tissulaires [553,554].

Ainsi, lors de l'initiation de l'inflammation, le microenvironnement s'enrichit en cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6, ...) et en chimiokines qui vont permettre le recrutement de nouveaux leucocytes tels que les monocytes et les neutrophiles (**Figure 34**). De plus, ce microenvironnement est enrichi en molécules telles que l'histamine, les leucotriènes et les prostaglandines qui vont induire une vasodilatation, augmenter le flux sanguin et la perméabilité vasculaire, facilitant ainsi le recrutement de nouveaux monocytes.

b. Phase II : Recrutement des monocytes

Le recrutement de nouveaux leucocytes est possible grâce au processus de chimiotactisme. Les macrophages résidents sécrètent des cytokines pro-inflammatoires qui peuvent activer les cellules endothéliales. Les cellules endothéliales vont alors produire des chimiokines qui, additionnées avec les chimiokines produites par les macrophages, participent à la mise en place d'un gradient chimiotactique qui oriente la migration des cellules inflammatoires [577]. Les cellules principalement recrutées lors de l'inflammation sont les monocytes et les neutrophiles. Leur migration fait intervenir de nombreuses chimiokines [575]. Une des principales chimiokines, produite en grande quantité et par la plupart des cellules durant l'inflammation est le CCL-2. Son récepteur, CCR2, est fortement exprimé par les monocytes « classiques » et permet leur recrutement au niveau du site inflammatoire.

c. Phase III : Elimination des cibles

Après leur recrutement au site inflammatoire, les monocytes se différencient en macrophages et participent à l'élimination des menaces. Durant cette phase, les macrophages présentent un phénotype de type M1. Ils sécrètent alors des cytokines telles que l'IL-1 β et le TNF- α qui facilitent le recrutement de nouveaux leucocytes, mais aussi de l'IL-12 et de l'IL-23 qui renforcent les réponses Th1 et Th17 antimicrobiennes (**Figure 35**). Enfin, ils sécrètent également des MMP-2 et MMP-9 qui dégradent la MEC et facilitent le recrutement de cellules pro-inflammatoires [578]. En plus de leur sécrétion de cytokines, les macrophages produisent également de facteurs antimicrobiens comme le NO (Oxyde Nitrique), la NADPH oxydase (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate oxydase) et des ROS.

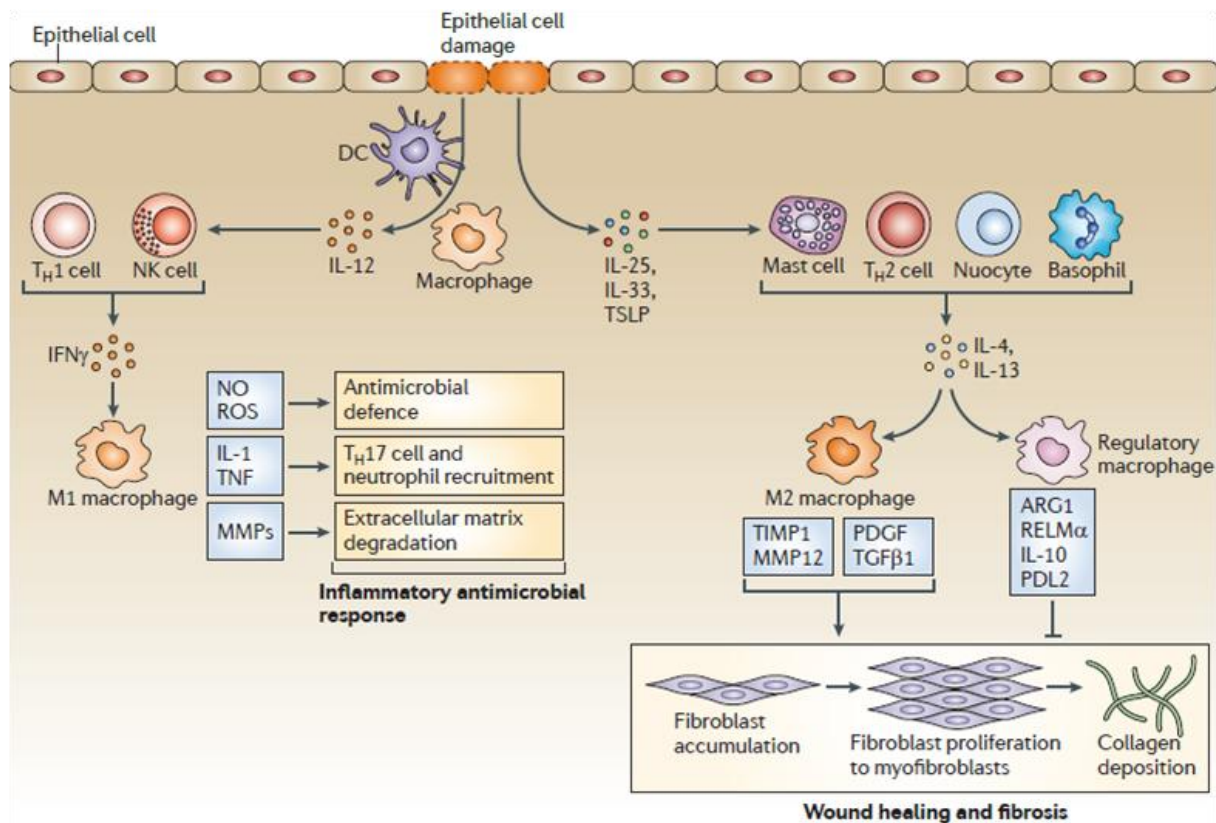


Figure 35 : Réponse inflammatoire et réparatrice des macrophages. [565].

Les macrophages sont également des cellules phagocytaires professionnelles qui peuvent internaliser et dégrader des particules de grande taille. Cette phagocytose est initiée par la reconnaissance de DAMPS ou de PAMPS par les nombreux PRR des macrophages et permet l'élimination de bactéries et d'autres particules (cellules apoptotiques, ...) (**Figure 36**). Les macrophages peuvent également phagocyter des cibles opsonisées par des anticorps *via* leurs récepteurs aux fragments Fc (CD16, CD36 et CD64) [579]. Enfin, les macrophages établissent un dialogue privilégié avec les autres cellules pro-inflammatoires telles que les neutrophiles. Ainsi, les neutrophiles libèrent différents médiateurs solubles tels que la myéloperoxydase et la cathepsine G, et activent la phagocytose et la production de ROS par les macrophages [580,581]. En retour, les macrophages produisent de l'IL-1 β et du TNF- α qui allongent la durée de vie des neutrophiles [580].

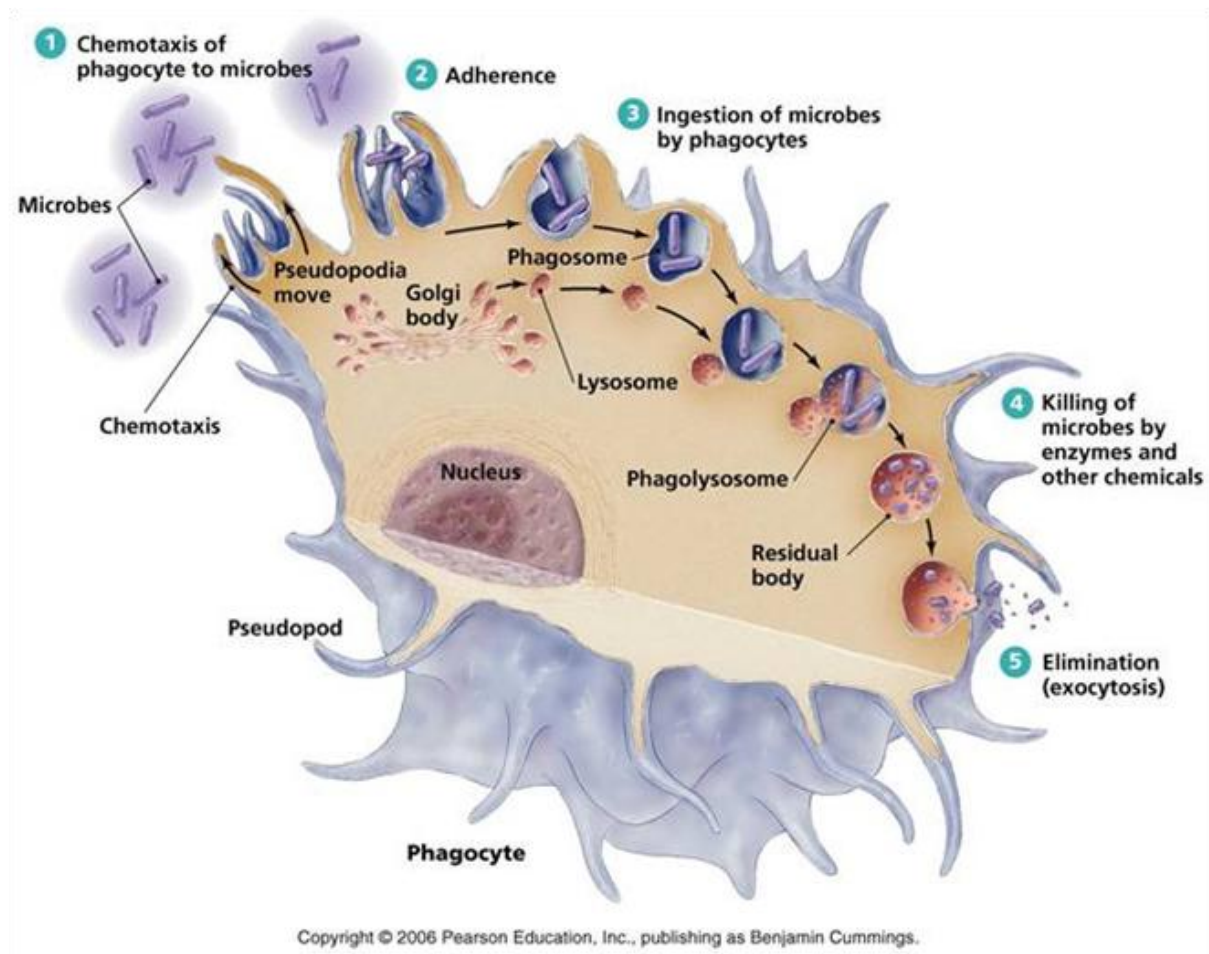


Figure 36 : Les étapes de la phagocytose.

d. Phase IV : Résolution de l'inflammation

Après l'élimination du stimulus inflammatoire, l'activation des M1 diminue et l'environnement cytokinique change radicalement. La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires diminue et les cellules épithéliales endommagées produisent de l'IL-25 et de l'IL-33 (**Figure 35**). Cette modification du microenvironnement entraîne alors une transition de la réponse inflammatoire vers la réponse réparatrice. Durant cette phase, les macrophages switchent vers un phénotype M2 et prolifèrent localement sous l'action de l'IL-4 [561]. Ces macrophages M2 favorisent la cicatrisation et la fibrose en produisant des MMP-12, du PDGF et du TGF- β .

La résolution de l'inflammation s'accompagne également d'un switch des médiateurs lipidiques avec une accumulation de lipoxines anti-inflammatoires qui vont permettre de stopper le recrutement des neutrophiles et de favoriser leur phagocytose par les macrophages M2, en parallèle de l'élimination des débris cellulaires et des cellules apoptotiques [582-584]. Cette phagocytose par les M2 s'accompagne d'une sécrétion d'IL-10 et de TGF- β qui favorisent également la résolution de l'inflammation.

D. Les Lymphocytes T (LT)

1. Le développement des LT

Les lymphocytes T se développent dans le thymus à partir d'un progéniteur lymphoïde qui migre depuis la moelle osseuse. Dans le microenvironnement thymique, les thymocytes (progéniteurs T) vont maturer en interagissant avec des CPA mais également des cellules épithéliales du cortex et de la medulla thymique [585,586]. La maturation thymique est finement régulée et nécessite une migration progressive du cortex vers la médulla durant les thymocytes subissent des étapes de sélection rigoureuses (**Figure 37**).

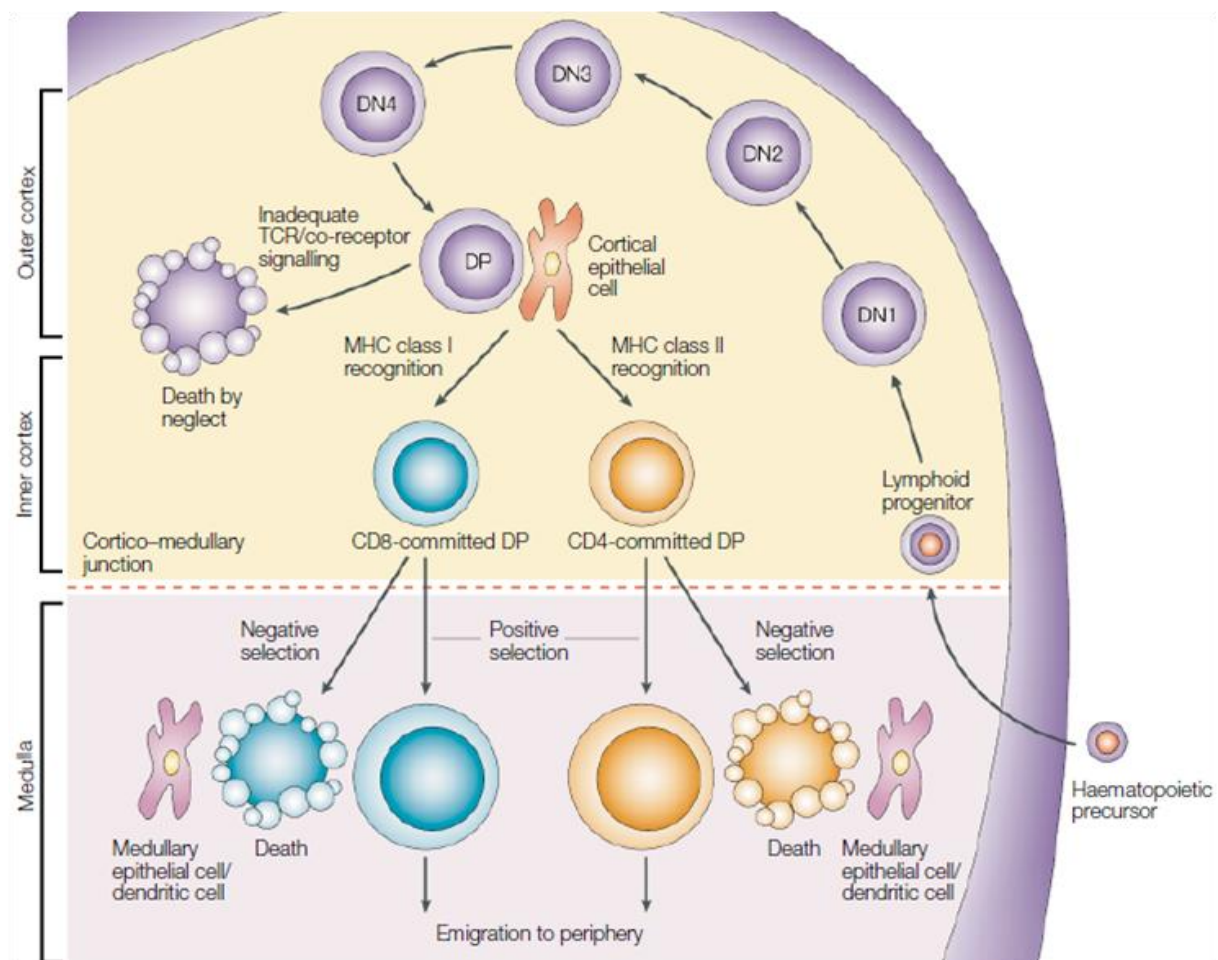


Figure 37 : Développement thymique des lymphocytes T. [587].

Dans les premiers stades de leur développement, les thymocytes n'expriment pas de TCR (T Cell Receptor) ni de co-récepteur (CD4 ou CD8). On parle alors de cellules « doubles négatives ». Ces cellules vont ensuite s'engager dans différentes étapes de maturation qui vont leur permettre de proliférer, de réarranger les chaînes α et β de leur TCR, et exprimer les molécules CD4 et CD8 ; devenant alors des thymocytes « doubles positifs ». Elles vont ensuite subir deux étapes de sélection successives. Au niveau du cortex, seuls les

thymocytes capables d'interagir avec le CMH avec une affinité intermédiaire seront sélectionnés. Les autres thymocytes (trop ou pas assez affins) seront éliminés. Les thymocytes sélectionnés positivement conservent alors leur expression du co-récepteur associé à la spécificité de leur TCR (CD8 pour CMH-I et CD4 pour CMH-II) mais perdent l'autre ; devenant alors des thymocytes « simples positifs ». Les cellules s'engagent ensuite dans la sélection négative au niveau de la médulla qui sélectionnera uniquement les thymocytes qui ne réagissent pas à des antigènes du soi. Les cellules autoréactives seront éliminées [588-590].

La sélection thymique permet de produire des LT naïfs (qui n'ont pas rencontré d'antigène) et d'éliminer les cellules autoréactives [591]. Les LT matures quittent alors le thymus, rejoignent les organes lymphoïdes secondaires dans l'attente de rencontrer leur antigène. C'est dans les organes lymphoïdes secondaires que les LT naïfs vont être activés par les CPA. Ils vont ensuite proliférer de manière clonale et se différencier pour former un pool de cellules mémoires qui répondra plus fortement et plus rapidement en cas de nouvelle rencontre avec le même pathogène [592,593]. En parallèle, certains LT (LTreg) peuvent également recirculer vers le thymus et réguler le développement de leurs précurseurs [594].

2. L'activation des LT naïfs

L'activation des LT a lieu dans la zone paracorticale des ganglions lymphatiques, lors de la rencontre entre un LT et une CPA qui présente un complexe CMH/peptide qu'il reconnaît [595-597]. Les DC capturent les antigènes en périphérie et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires pour les présenter. En parallèle, elles mûrissent en augmentant leur nombre de molécules de CMH et de molécules de costimulation (CD80, CD86, CD40, ...). Une fois dans les organes lymphoïdes secondaires, elles vont sécréter des chimiokines pour attirer les LT et leur présenter l'antigène [598].

L'activation des LT nécessite trois signaux qui sont essentiels à leur différenciation, leur fonction et leur survie (**Figure 38**). Le premier signal est l'interaction entre le TCR et le complexe CMH/peptide qui active les LT spécifiques de l'antigène. Le deuxième signal est l'interaction entre le LT et la CPA *via* les molécules de costimulation qui régulent l'intensité du signal d'activation [599-601]. Le troisième signal est la stimulation par les cytokines qui vont permettre la polarisation de la réponse [602]. L'absence d'un de ces signaux conduit à une activation incomplète des LT qui deviennent hyporépondeurs ou anergiques [603].

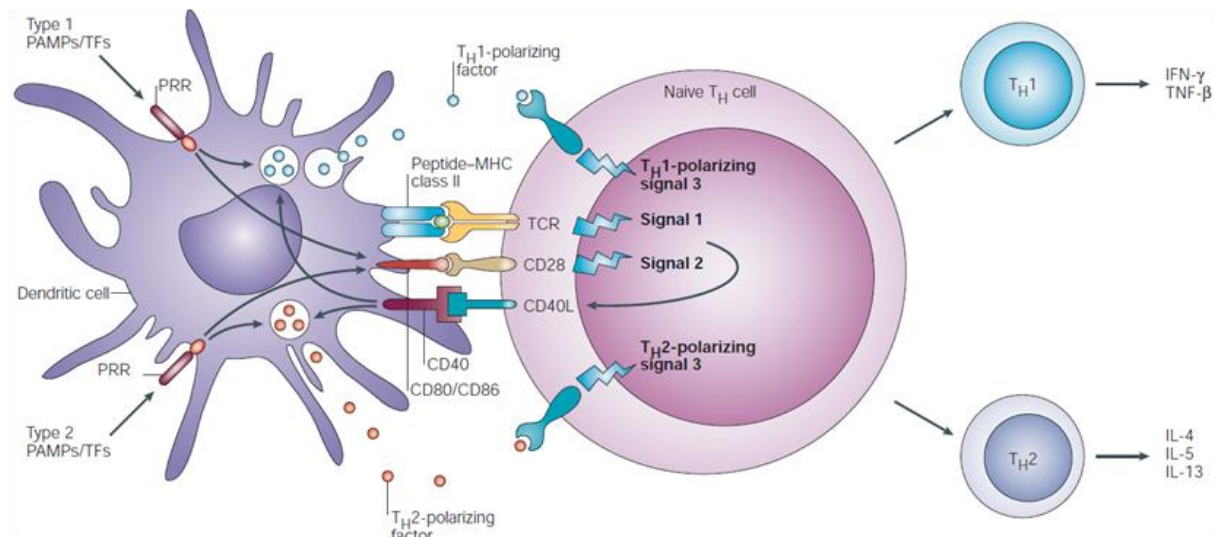


Figure 38 : Les trois signaux nécessaires à l'activation des LT. [604].

a. Signal 1 : Interaction TCR/CMH/peptide

Le premier signal correspond à l'interaction du TCR avec un complexe CMH/peptide. Les LT CD4 interagissent avec le CMH-II alors que les LT CD8 interagissent avec le CMH-I. Les co-récepteurs CD4 et CD8 participent activement à cette reconnaissance en interagissant avec le TCR et en amplifiant le signal [605,606]. Lors de l'engagement du TCR par un complexe CMH/peptide, une synapse immunologique se forme entre le LT et la CPA, ce qui permet d'induire les voies de signalisations nécessaires à l'activation, la différenciation et la maturation du LT naïf en LT effecteur [607]. L'activation des LT s'accompagne également d'une modification de leur phénotype caractérisée par l'induction de différents marqueurs d'activation tels que CD25 (chaîne α du récepteur à l'IL-2), CD69 (activation précoce), Ki67 (marqueur de prolifération), CD38 (transduction du signal) et HLA-DR (CMH-II) [608-611].

b. Signal 2 : Molécules de costimulation

Lors de l'activation des LT, le deuxième signal implique l'interaction entre des co-récepteurs, et leurs ligands exprimés par les CPA. Ces co-récepteurs, qui peuvent être activateurs ou inhibiteurs, permettent de transmettre les signaux de costimulation nécessaires aux LT [607]. Parmi ces co-récepteurs, le CD27 et le CD28 sont exprimés constitutivement par les LT naïfs et permettent une costimulation positive. Les autres co-récepteurs sont induits après la reconnaissance d'un antigène par le TCR.

Après interaction entre un TCR et un complexe CMH/peptide, les molécules de costimulation se regroupent au niveau de la synapse immunologique où elles vont former des clusters et agir en synergie pour moduler l'activation des LT [612]. Les récepteurs pourront alors transmettre des signaux activateurs (CD27, CD28, CD40, ICOS, 4-1BB, OX40, ...) mais

aussi des signaux inhibiteurs (PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, ...) au LT ; qui vont moduler le signal délivré *via* le TCR [607]. De plus, les LT expriment également certains NKR (CD160 et 2B4) qui transmettent des signaux inhibiteurs. Il a notamment été montré que CD160 interagit avec la protéine HVEM (Herpesvirus Entry Mediator) et inhibe l'activation des LT CD4 [613]. Ainsi, l'état d'activation des LT dépendra de la balance entre les signaux de costimulation activateurs et inhibiteurs.

Les molécules de costimulation permettent une régulation temporelle de la réponse des LT. Ainsi, lors de la rencontre entre un LT et une CPA, les signaux seront majoritairement activateurs pour permettre la mise en place de la réponse effectrice. L'interaction entre le co-récepteur CD28 et les molécules de costimulation CD80 et CD86 exprimées par les DC permet d'activer la prolifération et la survie des LT mais également la production d'IL-2 [614,615]. Les récepteurs inhibiteurs sont cependant présents pour éviter la sur-activation des LT. Au contraire, durant la phase de contraction, les molécules de costimulation négatives deviennent majoritaires et permettent de bloquer l'activité des LT et permettre la résolution de la réponse immune.

Les récepteurs inhibiteurs permettent ainsi de réguler la réponse des LT. Cependant, lors d'infections chroniques ou de cancers, la stimulation antigénique persistante induit une augmentation de l'expression de ces récepteurs qui inhibent la réponse T et sont responsables du phénomène d'exhaustion (épuisement) des LT. Cette exhaustion est alors responsable d'une augmentation de l'apoptose des LT, associée à une perte partielle ou totale de leurs fonctions effectrices [616,617].

c. Signal 3 : Polarisation des LT par les cytokines

Le troisième signal provient des cytokines produites par les DC [602,618]. En fonction de la nature des cytokines sécrétées, les LT CD4 vont se polariser en LT auxiliaires ou « helper » (Th) qui expriment des facteurs de transcription spécifiques et ont des fonctions bien distinctes (**Figure 39**) :

- En présence d'IL-12, les LT deviennent des cellules Th1 qui expriment Tbet et participent à l'élimination de pathogènes intracellulaires en sécrétant de l'IFN- γ .
- En présence d'IL-4, les LT deviennent des cellules Th2 qui expriment GATA3 et participent à l'élimination de parasites extracellulaires en sécrétant de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13. Ils sont également impliqués dans la pathogenèse de l'asthme allergique [619].
- En présence d'IL-6 et de TGF- β , les LT deviennent des cellules Th17 qui expriment ROR γ t et participent à l'élimination de pathogènes fongiques et de bactéries extracellulaires en sécrétant de l'IL-17 et de l'IL-22. Ils sont également impliqués

dans le développement de pathologies auto-immunes inflammatoires telles que la sclérose en plaques [620].

- En présence d'IL-6 et d'IL-21, les LT deviennent des cellules Tfh folliculaires qui expriment BCL-6 et participent à l'activation des LB ainsi qu'à la mise en place de la réponse humorale en sécrétant de l'IL-21 [621].
- En présence d'IL-4 et de TGF- β , les LT deviennent des cellules Th9 qui expriment PU.1 et participent à l'élimination de pathogènes extracellulaires en sécrétant de l'IL-9 [622].
- Enfin, en présence de TGF- β et de l'IL-2, les LT deviennent des cellules LTreg « induits » qui expriment FoxP3 et exercent des fonctions immunosuppressives en sécrétant de l'IL-10 et du TGF- β . Elles constituent une population complémentaire mais distincte des LT « naturels » générés dans le thymus [623].

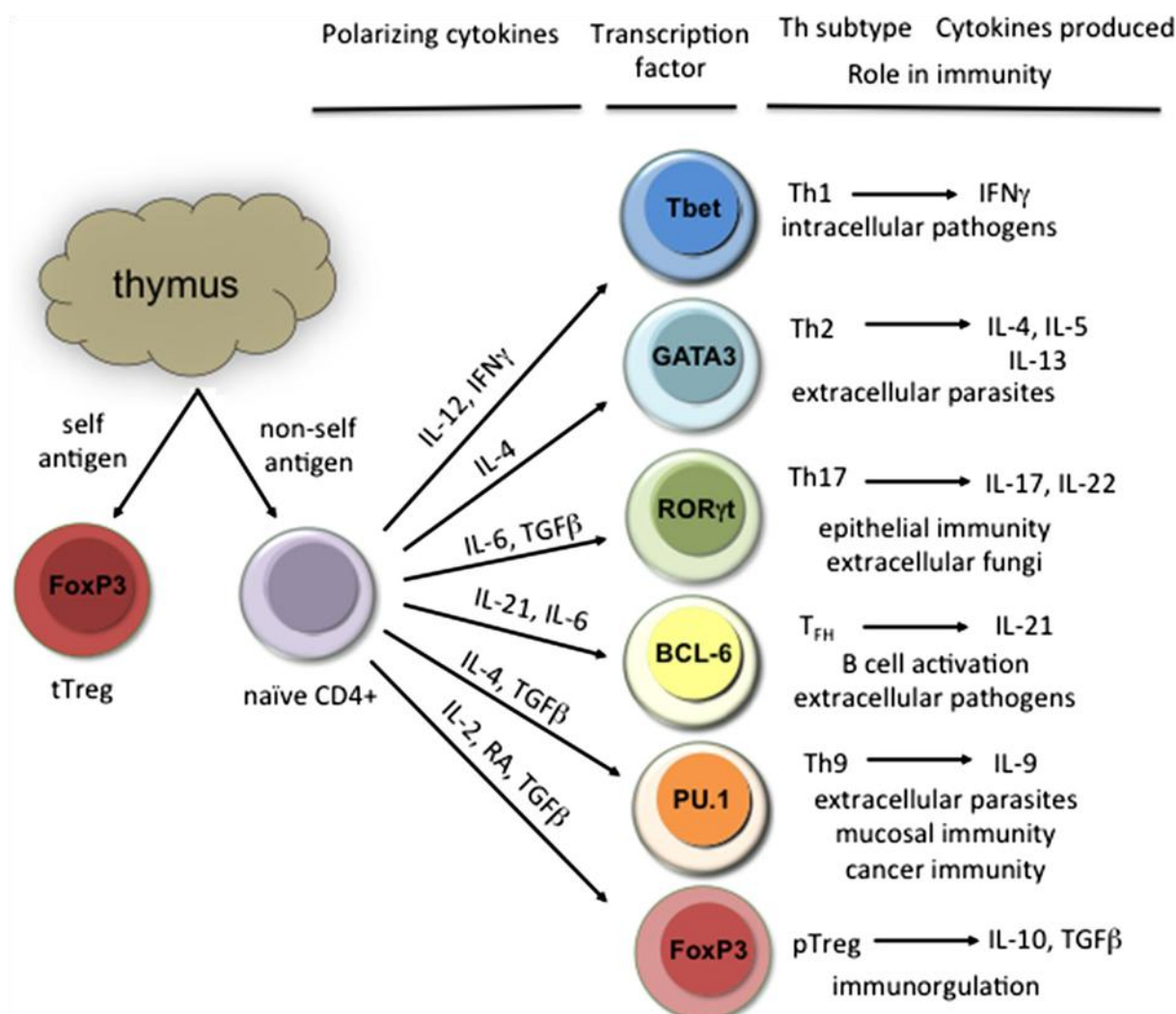


Figure 39 : La polarisation des LT CD4 par les cytokines. [624].

Comme pour les LT CD4, les LT CD8 peuvent également se polariser en fonction des cytokines produites par les CPA. Ainsi, on distingue les cellules Tc1, Tc2, Tc17 et LTreg

CD8 [625-628]. Cependant, les LT CD8 sont majoritairement des cellules de type Tc1, dotées d'un fort potentiel cytotoxique. En ce sens, les LT CD8 effecteurs ont des fonctions remarquablement similaires aux cellules NK tant en terme de potentiel cytotoxiques (granules lytiques et récepteurs à domaine de mort) que de production cytokinique (sécrétion d'IFN- γ et de TNF- α) [629].

3. Mise en place de la mémoire des LT

L'activation des LT naïfs (LT_N) par l'antigène dont ils sont spécifiques induit leur prolifération. Durant cette phase de prolifération clonale, le nombre de LT_N spécifiques de l'antigène passe de 10^2 à 10^5 cellules en quelques jours [630,631]. Cette prolifération extensive s'accompagne également d'une augmentation des fonctions effectrices des LT [632]. Après l'élimination de la menace, les LT vont subir une phase de contraction qui conduira à la mort de 90-95% des cellules pour retourner à un état d'équilibre homéostatique [633,634]. Les 5-10% de cellules restantes vont alors devenir quiescentes et se différencier en populations de LT mémoires en fonction de la force du signal reçu *via* le TCR (**Figure 40**) [635,636]. Ces cellules mémoires ont une longue durée de vie et sont capables de réagir plus rapidement que les cellules naïves en cas de restimulation par le même antigène ou de réinfection par le même pathogène [637].

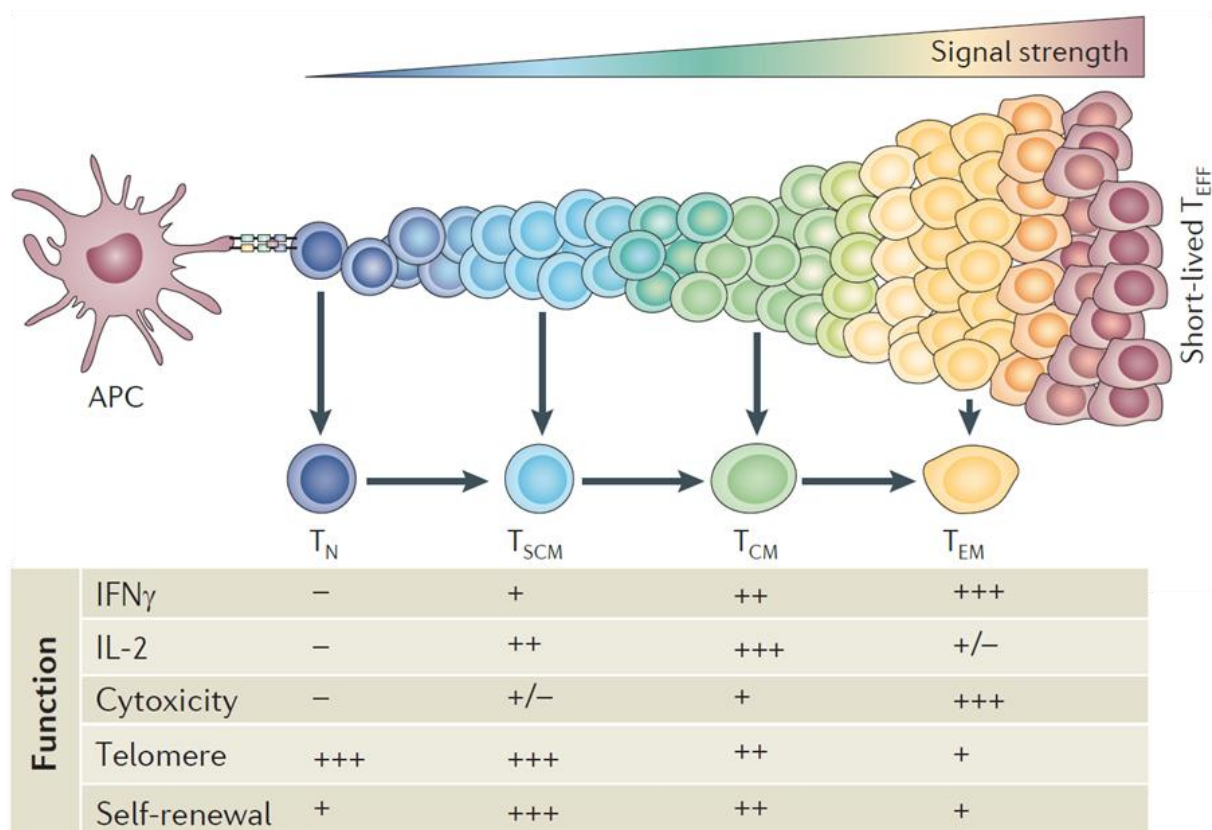


Figure 40 : Modèle de différenciation progressive des LT. Adapté de [638].

Les LT_N sont caractérisés par leur expression de l'isoforme RA de la molécule CD45 (CD45RA), de la L-sélectine (CD62L), des co-récepteurs CD27/CD28 et du récepteur aux chimiokines CCR7 [639]. Ce phénotype leur permet d'entrer dans les organes lymphoïdes secondaires, de s'activer au contact des DC et d'initier une réponse effectrice. Cette activation s'accompagne de la mise en place d'une réponse mémoire associée à la perte d'expression de CD45RA et une induction de l'expression de CD45RO, marqueur caractéristique des LT ayant rencontré un antigène [640,641].

Parmi les cellules CD45RA⁻ CD45RO⁺, on distingue deux sous populations de LT mémoires qui diffèrent par leur expression de CCR7 et de CD62L [642]. Les LT centraux mémoires (LT_{CM}) conservent leur expression de CCR7 et CD62L, ce qui leur permet de recirculer dans les organes lymphoïdes secondaires. Au contraire, les LT effecteurs mémoires (LT_{EM}) perdent leur expression de CCR7, ce qui les oblige à rester dans la circulation sanguine ou dans les organes non lymphoïdes [643]. Lorsqu'elles rencontrent leur antigène, les LT mémoires répondent rapidement en proliférant, en produisant des cytokines et en permettant la génération de nouveaux LT effecteurs (LT_{EFF}) à courte durée de vie [644]. De plus, les LT_{CM} et les LT_{EM} induisent des réponses différentes après restimulation. Ainsi, les LT_{EM} sont dotés d'une grande capacité cytotoxique et produisent de l'IFN- γ alors que les LT_{CM} sécrètent massivement de l'IL-2 (**Figure 40**) [642,645].

Plus récemment, une nouvelle sous-population de LT de type cellule souche mémoires (LT_{SCM}) a été identifiée. Il a été montré que cette population est CD45RA⁺ CD45RO⁻ CCR7⁺ et a le potentiel pour générer l'ensemble des autres sous-populations mémoires et effectrices [646]. Ainsi, le phénotype et les fonctions des LT_{SCM} suggèrent qu'elles sont proches des LT_N et supportent un modèle de différenciation : LT_N => LT_{SCM} => LT_{CM} => LT_{EM} => LT_{EFF} (**Figure 40**).

Enfin, les LT mémoires ont une longue durée de vie et un nombre de cellules qui reste constant. Plusieurs études ont montré que le maintien du pool de LT mémoires est dû à leur capacité d'auto-renouvellement. Ainsi, l'homéostasie des LT mémoires est sous le contrôle de cytokines telles que l'IL-7 et l'IL-15 [647-649].

E. L'immunité au niveau de la decidua basalis

La *decidua basalis* est composée de cellules stromales, de cellules endothéliales et de cellules épithéliales. Elle est également enrichie en cellules immunitaires qui représentent 40% des cellules totales [650]. Parmi les populations immunes, on retrouve notamment des cellules NK (dNK, 70%), des macrophages (dM, 20%) et des LT (10%) qui ont des fonctions bien distinctes de leurs homologues périphériques (**Figure 41**). On retrouve également

quelques populations d'ILC3 [651].

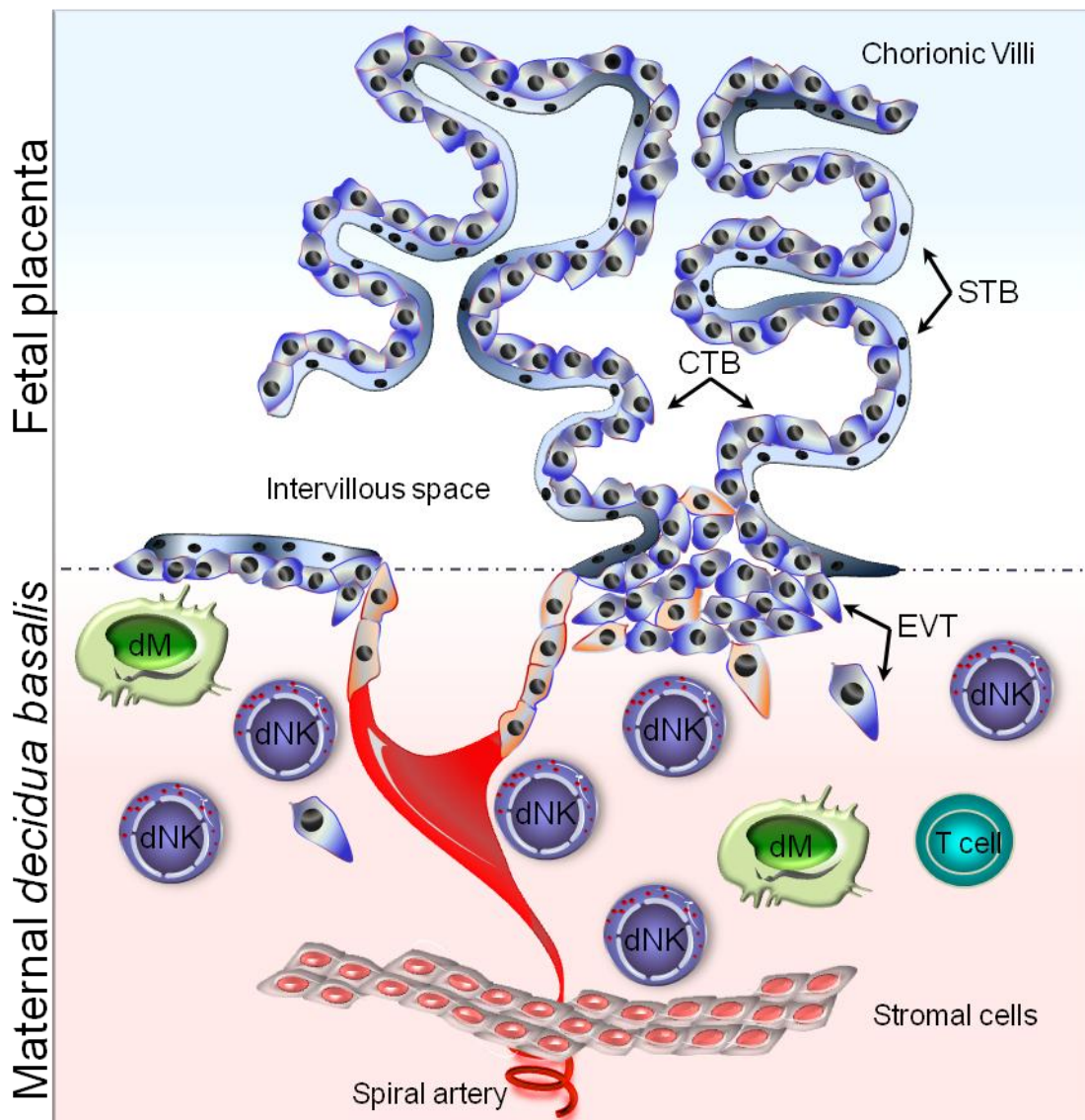


Figure 41 : Représentation schématique de la *decidua basalis*.

1. Les cellules NK décíduales (dNK)

Les cellules NK sont des effecteurs importants de l'immunité innée qui assurent la protection de l'organisme au niveau sanguin et tissulaire. Durant la grossesse, une population de cellules NK particulière (dNK) apparaît dans la *decidua basalis* pour réguler le bon déroulement de la grossesse et protéger le fœtus [652].

a. Phénotype des cellules dNK

Les cellules dNK sont majoritairement $CD56^{\text{bright}}CD16^-$, et expriment un large répertoire de récepteurs activateurs et inhibiteurs très conservé entre les individus [653]. Elles ressemblent aux cellules pNK $CD56^{\text{bright}}$ du sang et des tissus, de par leur forte expression

de l'hétérodimère CD94/NKG2 [654]. Elles présentent également des similarités avec les cellules pNK CD56^{dim} de par leur expression des KIR [655]. Ainsi, les cellules dNK ont un phénotype unique caractérisé par l'expression de nombreux récepteurs activateurs (NKp46, NKp44, NKp30, NKG2C, NKG2D et 2B4) mais aussi de nombreux récepteurs inhibiteurs (NKG2A, KIR2DL1, KIR2DL2/3, KIR2DL4, KIR3DL2 et ILT2) [653,656]. Le fait que les cellules dNK expriment constitutivement NKp44 mais aussi CD69 et CD25 suggère qu'elles sont constitutivement activées dans le microenvironnement décidual.

En plus de leurs différences phénotypiques, les cellules dNK diffèrent également des cellules pNK de par leur transcriptome. Ainsi, il a été montré que les cellules dNK expriment de manière différentielle certains gènes par rapport aux cellules pNK [657]. Parmi les molécules surexprimées par les cellules dNK, on distingue des NKR (NKG2C et NKG2E), des intégrines (α D, α X, β 1 et β 5) et certaines tétraspanines (CD9, CD53, CD63 et CD151). Ces données suggèrent que les cellules dNK constituent une population unique, bien distincte des cellules pNK. De plus, l'expression de CD9 a été suggérée comme étant un marqueur spécifique de l'acquisition du phénotype décidual par les cellules NK [658].

Contrairement aux cellules pNK CD56^{bright}, les cellules dNK possèdent de nombreuses granules lytiques et expriment la perforine, les granzymes et la granulysine à un niveau plus important que les cellules pNK CD56^{dim} [657]. Elles expriment également des molécules immuno-régulatrices telles que la galectine-1 (Gal-1). Concernant les récepteurs aux chimiokines, elles expriment CXCR3 et CXCR4 mais pas ou peu les récepteurs CCR(1-7), CXCR1 et CX3CR1 qui peuvent être exprimés par les cellules pNK [659].

Enfin, comme pour les cellules pNK, il a récemment été décrit que les cellules dNK pouvaient avoir des propriétés « mémoire-like ». Ainsi, après une première grossesse, une sous population de cellules dNK exprimant fortement les récepteurs NKG2C et ILT2 persiste parmi le pool de cellules dNK [660]. Il a été montré que ces cellules « entraînées » répondront plus efficacement et produiront de plus grandes quantités de facteurs solubles lors d'une grossesse ultérieure.

b. Fonction sécrétrice des cellules dNK

Bien qu'elles expriment la machinerie lytique, la proximité phénotypique des cellules dNK avec les cellules pNK CD56^{bright} laisse penser que leur fonction principale est la sécrétion de facteurs solubles. En accord avec cette possibilité, plusieurs études indiquent que la fonction sécrétrice des cellules dNK participe activement à l'invasion de la décidua par les CTEV et au remodelage des artères spiralées maternelles. Ces deux processus sont essentiels à la mise en place de la placentation hémochoriale et au bon déroulement de la grossesse (**Figure 42**).

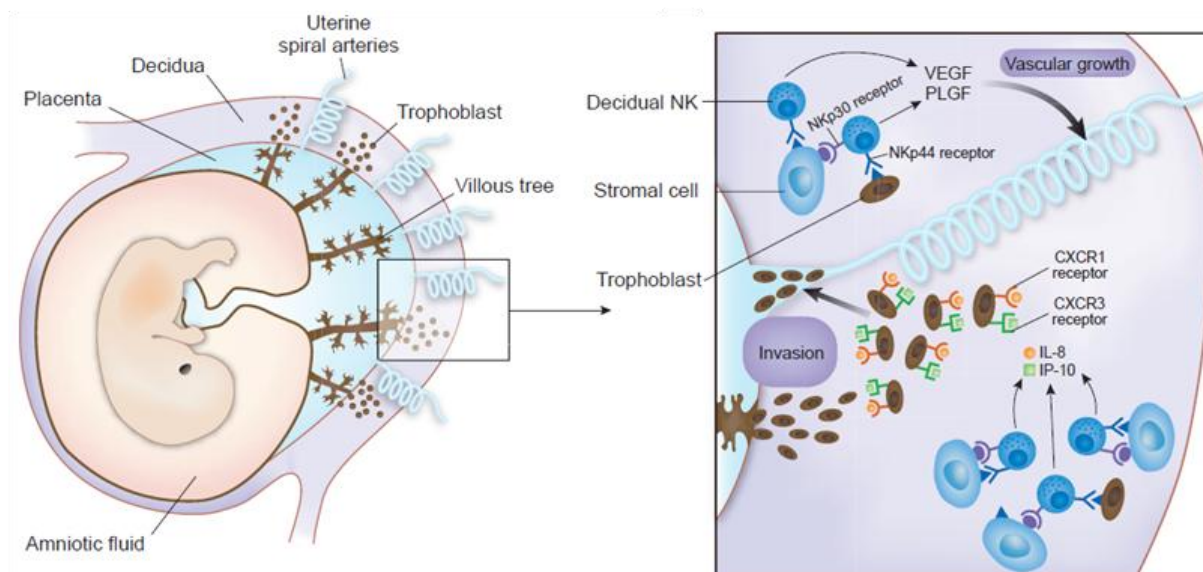


Figure 42 : Régulation de la placentation par les cellules dNK. [661].

Les cellules dNK participent activement au remodelage vasculaire utérin en sécrétant de nombreux facteurs solubles qui induisent l'apoptose des cellules endothéliales maternelles et permettent le recrutement des CTEV endovasculaires. Elles sécrètent notamment de l'Ang-1 (Angiopoïétine), de l'Ang-2, du VEGF, du PLGF (Placental Growth Factor) et de l'IFN- γ , dont les récepteurs sont exprimés au niveau des artères spiralées maternelles [662]. L'Ang-2 induit l'apoptose des cellules endothéliales alors que le VEGF augmente la perméabilité vasculaire [663,664]. De plus, il a été montré *in vitro* et *in vivo* que les cellules dNK favorisent la migration des cellules endothéliales et l'angiogenèse de manière VEGF et PLGF dépendante [665]. Concernant le rôle de l'IFN- γ , il a été montré dans un modèle murin que la déficience en cellules NK ou en IFN- γ cause des défauts sévères du remodelage vasculaire [147]. Ces défauts sont cependant corrigibles par la reconstitution du pool de cellules NK ou l'injection d'IFN- γ exogène.

Après l'induction du remodelage vasculaire utérin, les cellules dNK participent activement au recrutement des CTEV endovasculaires qui vont tapisser les vaisseaux maternels et augmenter l'afflux sanguin vers le fœtus. Elles sécrètent des chimiokines telles que le CXCL-8 et le CXCL-10 qui vont interagir avec leurs récepteurs (CXCR1 et CXCR3 respectivement) exprimés par les CTEV et favoriser leur migration [665]. Les cellules dNK participent également à l'invasion des CTEV en sécrétant des MMP-2 et MMP-9 qui dégradent la MEC [666]. Enfin, les cellules dNK contrôlent également l'arrêt de l'invasion des CTEV en sécrétant de l'IFN- γ qui module l'effet des MMP-2 et MMP-9 [667].

En plus des molécules décrites précédemment, les cellules NK sécrètent du TNF- α , de l'IL-10, du GM-CSF, du G-CSF et du LIF. Ces facteurs solubles sont également essentiels au

bon déroulement de la grossesse et favorisent la mise en place du microenvironnement décidéal. Elles sécrètent également des facteurs de croissance qui participent directement à la croissance fœtale [668].

Enfin, en plus de leur rôle dans le bon déroulement de la grossesse, les cellules dNK participent également au contrôle des infections virales qui infectent la mère et peuvent se transmettre au fœtus. Il a ainsi été montré que, durant l'infection par le VIH, les cellules dNK sécrètent de l'IFN- γ qui change la polarisation des dM et leur confère une résistance naturelle à l'infection [574,669]. Cette résistance est perdue lorsque les cellules dNK ne sont plus en contact avec les dM ou lorsque l'IFN- γ est neutralisé par des anticorps bloquants, confirmant ainsi l'importance des contacts cellulaires et de l'IFN- γ dans le contrôle de l'infection.

c. Communication avec les trophoblastes

Les différentes étapes du remodelage vasculaire décidéal nécessite la collaboration entre les cellules dNK et les CTEV. Cette collaboration peut passer par la sécrétion de facteurs solubles mais également par des contacts cellulaires [670]. Les CTEV expriment la molécule de CMH-I non classique HLA-G qui peut interagir avec les récepteurs ILT2 et KIR2DL4 exprimés par les cellules dNK. Cette interaction régule l'activité des cellules dNK et induit la sécrétion d'IFN- γ , de TNF- α , d'IL-6, d'IL-1 β et de CXCL-8, qui favorisent le remodelage des artères spiralées [670-672]. De plus, les CTEV expriment des ligands de NKp30 et NKp44 qui induisent la sécrétion de nombreux facteurs solubles par les cellules dNK [665]. Ainsi, le VEGF permet de stabiliser HIF-1 α qui régule la différenciation des trophoblastes, et le CXCL-8 augmente la production de MMP-2 et MMP-9 par les CTEV qui favorise leur invasion [673-675]. Les CTEV expriment également HLA-E qui régule l'activité des cellules dNK en engageant le récepteur inhibiteur NKG2A [676].

Enfin, l'interaction KIR/HLA semble aussi être essentielle au bon déroulement de la grossesse. En effet, des études génétiques ont montré une augmentation du risque de pathologies de la grossesse lorsque la mère est de génotype AA (pas de KIR activateurs) et le fœtus est HLA-C2 [677]. Ce risque est encore plus important si le HLA-C2 exprimé par les CTEV dérive du père [678]. Le fait que les molécules de CMH-I dérivées du père entraînent une inhibition des cellules dNK plutôt que leur éducation pourrait expliquer cette pathogenèse exacerbée [679].

d. Fonction cytotoxique des cellules dNK

La grossesse s'apparente à une greffe semi-allogénique dans laquelle les CTEV qui envahissent la décidua expriment des antigènes fœtaux paternels. Ainsi, dans la *decidua*

basalis, les CTEV se trouvent en contact direct avec le système immunitaire maternel dont les cellules dNK qui représentent 70% des leucocytes présents localement. De par leur grand nombre et leur potentiel cytotoxique, les cellules dNK pourraient alors représenter une menace pour le fœtus. Ce n'est pourtant pas le cas, ce qui suggère un contrôle fin et efficace de leur capacité cytotoxique.

Plusieurs mécanismes pourraient expliquer cette régulation. Il a ainsi été suggéré que l'absence de cytotoxicité des cellules dNK était due à une incapacité à polariser leur machinerie lytique, résultant en la formation d'une synapse immunologique immature [680]. Il a également été montré que la sécrétion de VEGF par les cellules dNK permet d'augmenter l'expression du CMH-I qui inhibe la fonction lytique des cellules dNK en engageant les récepteurs inhibiteurs [681]. De plus, les cellules dNK n'expriment pas la molécule adaptatrice SAP [682]. Ainsi, l'engagement du corécepteur 2B4 par son ligand CD48 (exprimé par les cellules stromales et les cellules immunitaires déciduales) induit obligatoirement une signalisation inhibitrice. Enfin, les CTEV expriment différentes molécules anti-apoptotiques telles que XIAP et les serpins qui inhibent l'activité des granzymes et protègent de la lyse par les cellules dNK [683,684].

Il a longtemps été supposé que les cellules dNK étaient incapables d'avoir une activité cytotoxique. Cependant, plusieurs études ont permis de remettre en cause cette croyance. En utilisant des tests de cytolyse redirigée, il a été montré que les cellules dNK sont capables d'exercer une activité cytotoxique après engagement de NKp46 et de NKG2C [653]. En revanche, l'engagement de NKp30 n'induit pas la lyse des cellules mais uniquement une sécrétion cytokinique, ce qui suggère une fonction différente de ce récepteur dans les cellules dNK et pNK. L'activité cytotoxique des cellules dNK est cependant perdue lors du co-engagement par le récepteur NKG2A, ce qui suggère un rôle clé des récepteurs inhibiteurs dans le contrôle de la fonction des cellules dNK.

Plus récemment, notre équipe a prouvé que les cellules dNK sont également capables d'avoir une activité cytotoxique contre des fibroblastes décidaux infectés par le HCMV (**Figure 43**) [685]. Les cellules dNK sont capables de détecter et de tuer spécifiquement les cellules infectées *via* NKG2C/E et NKG2D. Il a depuis été montré que le récepteur activateur KIR2DS1 et le miARN-376a participent également au contrôle de l'infection [686,687]. Ce contrôle s'accompagne également d'une modification du sécrétome des cellules dNK [685]. De manière intéressante, ce modèle a également révélé une fonction inhibitrice du récepteur NKp44 qui inhibe la cytotoxicité des cellules dNK.

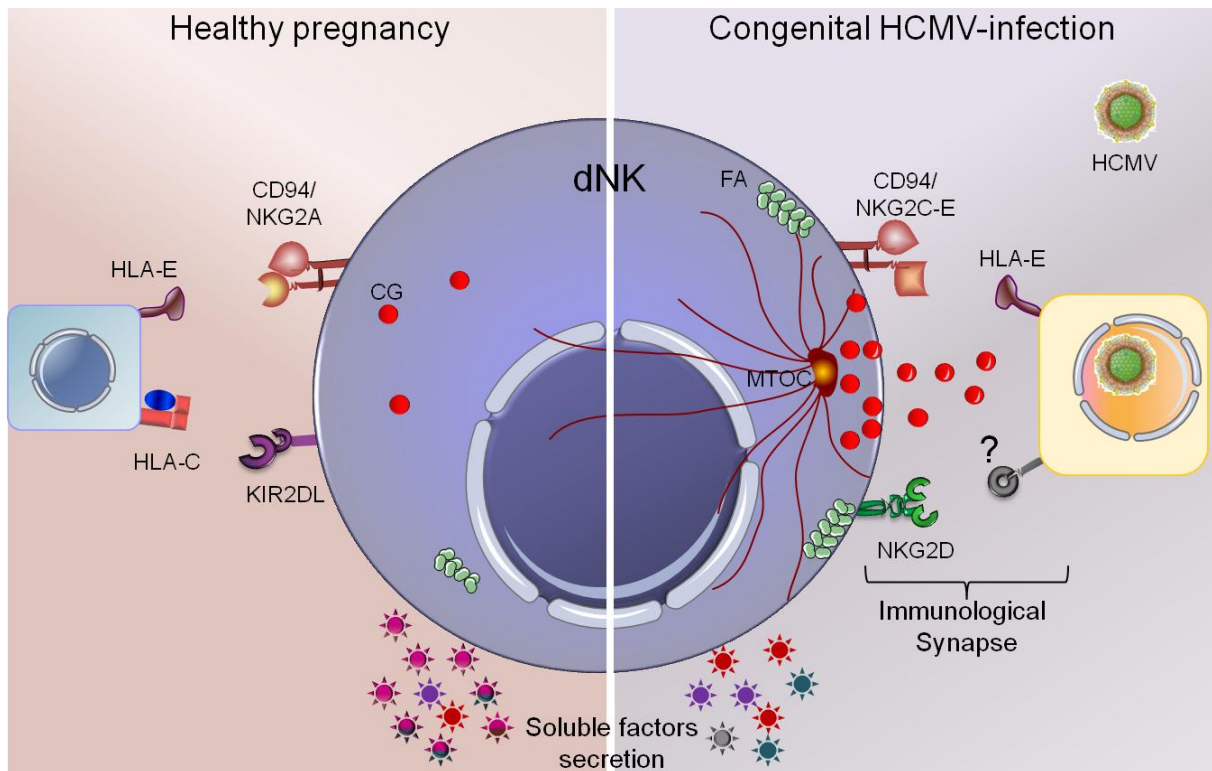


Figure 43 : Contrôle de l'infection HCMV par les cellules dNK. [652].

Ainsi, l'ensemble de ces études suggère que dans des conditions physiologiques, le potentiel cytotoxique des cellules dNK existe mais est parfaitement contrôlé. Il a notamment été montré qu'il permet l'élimination des cellules sénescents de la *decidua basalis* [688]. En revanche, ce contrôle peut être levé lors d'une infection virale au niveau de l'interface mère-fœtus. En réponse à l'infection et aux modifications du microenvironnement qui en résultent, les cellules dNK adaptent leurs fonctions effectrices pour éliminer les cellules infectées et prévenir la dissémination virale au fœtus [652].

e. Origine des cellules dNK

Même si le phénotype et la fonction des cellules dNK sont bien définis, leur origine en revanche reste mystérieuse et sujette à débats. Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer l'apparition des cellules dNK durant le premier trimestre de grossesse.

La première hypothèse suggère que les cellules dNK proviennent de cellules NK endométriales (eNK) présentes dans l'utérus non gestant. Ces cellules eNK ne produisent pas de cytokines, sont peu cytotoxiques et ont un phénotype et un profil transcriptomique distinct des autres populations de cellules NK [689,690]. Elles sont ainsi comme une population de cellules NK immatures qui « attendent » la grossesse. Durant la phase sécrétoire du cycle menstruel, la sécrétion de progestérone permet de stimuler la sécrétion d'IL-15 par les cellules stromales décíduales [691]. En réponse à cette IL-15, les cellules

eNK prolifèrent et acquièrent de nouvelles fonctions qui se rapprochent de celles des cellules dNK [690]. S'il n'y a pas d'implantation embryonnaire, le taux de progestérone chute brutalement et le nombre de cellules eNK retourne à son niveau basal. Au contraire, s'il y a eu implantation, le niveau d'IL-15 continue d'augmenter et les cellules eNK se différencient en cellules dNK. Ainsi, il a été montré *in vitro* que les cellules eNK stimulées par l'IL-15 acquièrent l'expression de NKp30 et NKp44, et sécrètent de l'IFN- γ et du CXCL-10 [690]. En revanche, elles ne sont toujours pas capables de sécréter du VEGF et du PLGF nécessaires au remodelage vasculaire utérin ce qui suggère que d'autres mécanismes sont nécessaires à la différenciation complète des cellules eNK en dNK.

La deuxième hypothèse suggère que les cellules dNK se différencient à partir de progéniteurs hématopoïétiques présents dans la couche basale de l'endomètre. Cette partie de l'endomètre est préservée durant le cycle menstruel et constituerait ainsi un réservoir de progéniteurs. Ainsi, durant la grossesse, ces progéniteurs se différencieraient en cellules dNK sous l'action du microenvironnement décidual enrichi en cytokines telles que l'IL-15 et le TGF- β [658]. En accord avec cette hypothèse, il a été montré que des précurseurs CD34⁺ sont présents dans la *decidua basalis* [692]. De plus, ces cellules expriment les facteurs de transcription E4BP4 et Id2 qui sont révélateurs de leur engagement dans le lignage NK.

Enfin, la troisième et dernière hypothèse suggère que les cellules dNK seraient dérivées de cellules pNK recrutées de la périphérie. Chez l'Homme, les cellules stromales déciduales et les trophoblastes sécrètent des chimiokines qui permettent le recrutement de cellules pNK depuis la circulation sanguine. L'endomètre humain sécrète de nombreuses chimiokines telles que CCL-4, CXCL-10, CXCL-11, CXCL-12, et CX3CL-1 [693-695]. De plus, les cellules stromales déciduales et les trophoblastes sécrètent CCL-2, CXCL-10, CXCL-12 et CX3CL-1 [696]. L'expression des chimiokines varie selon les phases du cycle menstruel ce qui suggère une régulation hormonale du chimiotactisme [697]. Il a été montré que les cellules pNK CD56^{bright} sont majoritairement recrutées dans la décidua grâce à leur expression préférentielle de CXCR4, le récepteur de CXCL-12 [659,698]. De plus, les CTEV produisent du CCL-3 qui attire préférentiellement les cellules pNK CD56^{bright} [699]. Enfin, les molécules d'adhésion telles que la L-sélectine (CD62L) participent également au recrutement des cellules NK dans les tissus. Le fait que (1) seules les cellules NK CD56^{bright} expriment CD62L et que (2) les cellules endothéliales déciduales expriment le ligand de CD62L uniquement pendant la phase sécrétoire, renforcent l'idée d'un recrutement préférentiel des cellules pNK CD56^{bright} dans la décidua [700,701].

Ainsi, les cellules dNK pourraient dériver de cellules eNK ou de progéniteurs CD34⁺ présents localement, mais aussi de cellules pNK CD56^{bright} recrutées depuis la périphérie. Cependant ces hypothèses ne sont pas exclusives et il est possible que les cellules dNK soient une

population hétérogène composée de cellules aux origines diverses qui se différencient en une population homogène sous l'effet du microenvironnement cytokinique décidual [702,703]. Les travaux auxquels j'ai participé durant ma thèse soutiennent cette possibilité (Partie III des Résultats).

2. Les macrophages décidaux (dM)

Les macrophages décidaux (dM) sont les principales CPA de la *decidua basalis* et représentent environ 20% des cellules immunes. Après le premier trimestre, leur nombre diminue progressivement pour ne représenter qu'une faible proportion des cellules immunes au terme de la grossesse [704].

a. Phénotype des dM

Les dM sont caractérisés par l'expression des marqueurs CD14 et de CD68. De plus, l'analyse de leur profil d'expression génique suggère qu'ils ont un phénotype immuno-régulateur [705]. Ils expriment différents marqueurs de cellules M2 tels que CD163, CD206 et DC-SIGN à leur surface [706-708]. En parallèle, ils expriment également des marqueurs de M1 tels que CD16, CD32, CD64 mais aussi CD80, CD86 et HLA-DR [707,709,710]. Enfin, ils expriment fortement le récepteur du VIH-1, CD4 et les co-récepteurs d'entrée CCR5 et CXCR4 [710]. Ainsi, les dM ont un phénotype intermédiaire et expriment simultanément de marqueurs M1 et M2.

b. Fonctions des dM

Les dM sécrètent des facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF et le G-CSF mais aussi des cytokines anti-inflammatoires telles que le TGF- β et l'IL-10 [671,711-713]. Ils produisent également des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et le TNF- α [713].

L'étude du profil transcriptionnel des dM suggère qu'ils sont impliqués dans le remodelage vasculaire [705]. Tout comme les cellules dNK, ils produisent des facteurs pro-angiogéniques tels que VEGF [712]. De plus, une infiltration abondante des dM autour des artères spiralées a lieu durant le remodelage vasculaire décidual, en parallèle de l'accumulation des cellules dNK [714,715]. Les dM sécrètent également des MMP-7 et MMP-9 qui dégradent la MEC et favorisent le remodelage vasculaire. Enfin, lors du remodelage vasculaire, les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales des vaisseaux maternels entrent en apoptose. Les dM phagocytent les corps apoptotiques, évitant ainsi la libération de leur contenu intracellulaire qui pourrait causer des dommages tissulaires et déclencher une réponse inflammatoire [716].

Il n'existe que peu d'études concernant le rôle des dM dans protection contre les

pathogènes. Il a cependant été montré que les dM sont capables de lier et de phagocyter des particules de bactéries et de levures [717]. De plus la stimulation des dM par le LPS (ligand de TLR-4) induit la sécrétion de TNF- α et des ROS.

Ainsi, la caractérisation des marqueurs exprimés par les dM associée à leur profil cytokinique suggèrent que ces cellules ont plutôt un phénotype M2 et des propriétés immuno-modulatrices qui leur permettent de réguler le remodelage vasculaire décidual et l'homéostasie tissulaire. Cependant ce phénotype n'est pas figé et peut être modifié si le microenvironnement cytokinique change.

3. Mécanismes de la tolérance fœtale

La réussite de la grossesse nécessite la mise en place de nombreux mécanismes d'inhibition de la réponse immunitaire pour permettre l'acceptation du fœtus semi-allogénique (**Figure 44**). Au niveau de la *decidua basalis*, les cellules fœtales sont en contact direct avec de nombreuses cellules immunes maternelles, majoritairement rattachées à l'immunité innée (90%). Les cellules de l'immunité adaptative sont donc très peu représentées durant la grossesse [718]. Plusieurs mécanismes immuno-régulateurs participent au contrôle de la réponse T. Les cellules stromales déciduales sécrètent des chimiokines qui permettent le recrutement de LT. Cependant, malgré l'expression de CXCL-9 et CXCL-10, très peu de LT CXCR3⁺ sont retrouvés *in situ*, suggérant un contrôle actif de leur recrutement [719]. Il a depuis été montré que ce défaut de recrutement est dû à des modifications épigénétiques dans les cellules stromales qui bloquent la transcription des gènes *CXCL9* et *CXCL10* durant le processus de décidualisation [720]. De telles modifications épigénétiques participent également à l'induction de l'état de quiescence décidual nécessaire au maintien de la grossesse [721].

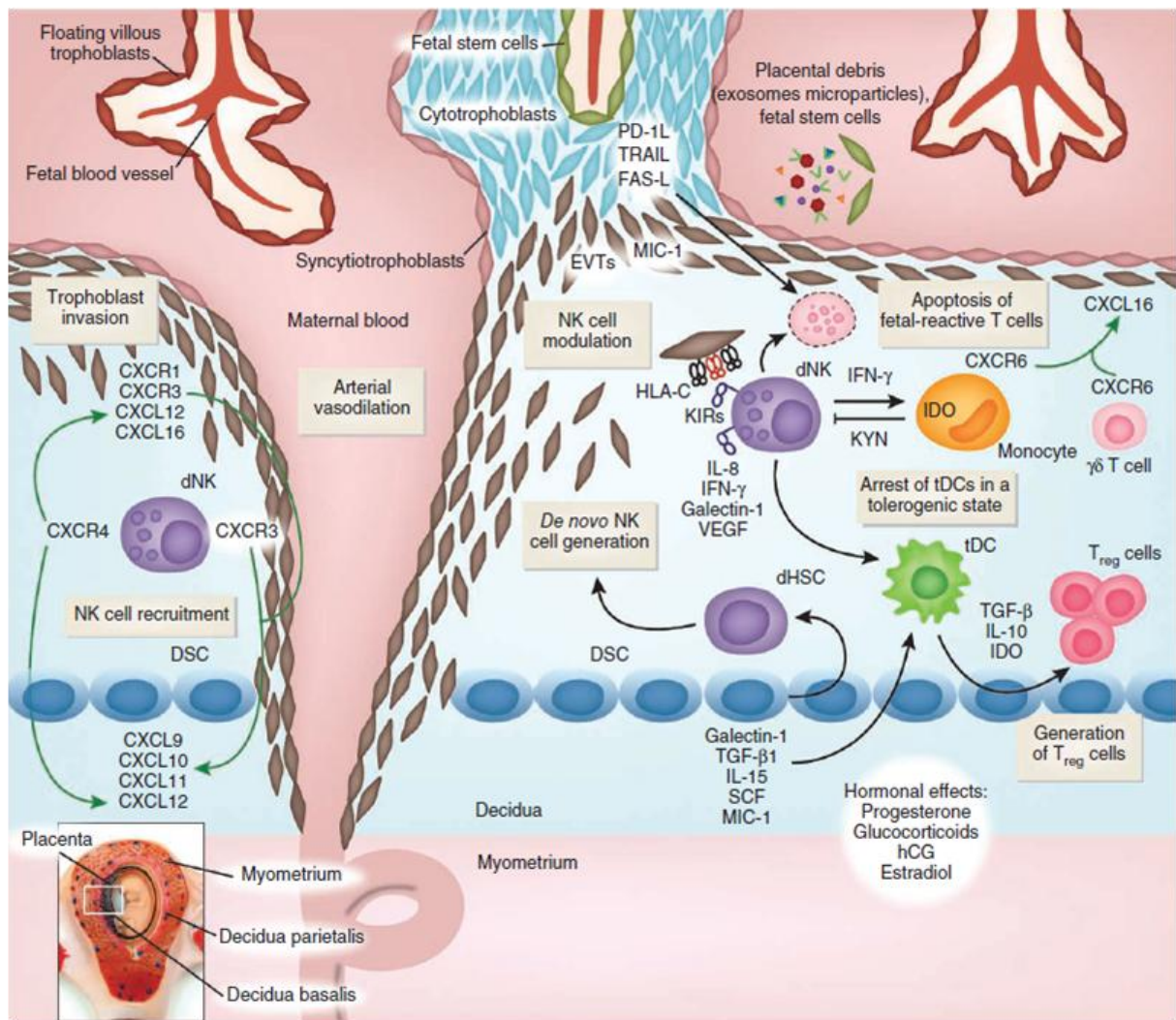


Figure 44 : Mécanismes immunosuppresseurs dans la *decidua basalis*. [722].

Le fœtus exprime des antigènes paternels qui peuvent déclencher des réponses allogéniques. En utilisant un modèle murin, il a été montré que les CPA déciduales peuvent capturer et présenter des antigènes fœtaux [723]. Cependant, elles ne modifient pas leur expression des récepteurs aux chimiokines ce qui empêche leur migration et prévient la mise en place d'une réponse T. Chez l'Homme, bien que de nombreux vaisseaux lymphatiques soient formés durant la grossesse, il n'existe aucune donnée suggérant que les CPA déciduales puissent les utiliser pour rejoindre les nœuds lymphatiques [724]. En périphérie, les DC peuvent également capturer des débris cellulaires et des microparticules dérivés du placenta [725]. Cependant, cette activation est sans conséquence sur le déroulement de la grossesse, malgré le fait que les LT activés puissent migrer vers le placenta. Afin d'éviter toute réponse immune contre le fœtus qui pourrait être délétère, plusieurs mécanismes d'immunosuppression sont mis en place. Les cellules stromales déciduales et les CTEV expriment PD-L1 et FasL qui se fixent à leurs récepteurs exprimés par les LT et induisent la mort par apoptose des cellules effectrices migrant vers la décidua [726,727]. Enfin, les

cellules stromales déciduales et les cellules dNK sécrètent de la Gal-1, qui induit la mort des LT par apoptose et permet l'induction de DC tolérogènes [728,729]. L'ensemble de ces mécanismes permet la délétion clonale des LT spécifiques d'antigènes foétaux, limitant ainsi les réponses alloréactives.

Il existe également un autre mécanisme qui favorise le maintien d'un microenvironnement pro-Th2 bloque la prolifération de LT alloréactifs. En réponse à l'IFN- γ , notamment produit par les cellules dNK, les CTEV, les dM et les DC sécrètent de l'IDO [730]. Cet IDO est essentiel à la tolérance foétale car sa déplétion cause un rejet systématique du fœtus par les LT [731]. L'IDO inhibe la prolifération des LT en déplaçant le tryptophane (un acide aminé non-essentiel) présent dans le microenvironnement décidual [732]. Le tryptophane est alors dégradé en kynurénine qui est toxique pour les LT, principalement les Th1 [733]. L'IFN- γ produit par les cellules NK permet également d'inhiber les réponses Th17, limitant ainsi l'inflammation locale [734]. Enfin, les dM et les DC produisent de l'IL-10 et du TGF- β , deux cytokines anti-inflammatoires immunosuppressives essentielles à la régulation du microenvironnement décidual.

En comparaison avec la périphérie, la proportion de LTreg (CD4 ou CD8) retrouvée dans la décidua est particulièrement élevée. Alors que la proportion de LTreg est de 5% dans le sang périphérique, cette proportion augmente jusqu'à 10% durant la grossesse [735]. De plus, 30% des LT CD4 de la décidua sont des LTreg. Cette forte augmentation pourrait s'expliquer par un recrutement de LTreg spécifiques d'antigènes foétaux au niveau de la décidua, comme observé chez l'Homme [736]. Chez la souris, la déplétion des LTreg conduit au rejet du fœtus [735]. De plus, les fortes concentrations de TGF- β et d'IL-10 dans le microenvironnement décidual favorisent la génération de LTreg induits [737]. Cette génération de LTreg induits est également augmentée au contact de CTEV exprimant HLA-G [738]. Enfin, il a été montré chez la souris que les LTreg induits sont les principaux effecteurs de la tolérance foétale et que leur absence spécifique conduit au rejet du fœtus [739]. Concernant les LTreg CD8, leur proportion est également augmentée dans la décidua durant la grossesse [740].

Il n'y a que très peu de LB dans la *decidua basalis*. Ils jouent cependant un rôle important dans la régulation de la grossesse en sécrétant du PIBF1 (Progesterone-Induced Blocking Factor 1) en réponse à la progestérone ou à l'IL-33 qui bloque le travail utérin et protège d'un accouchement prématuré [741]. Le faible nombre de LB dans la décidua pourrait s'expliquer par une délétion des LB spécifiques d'antigènes foétaux dans la moelle osseuse [742]. Enfin, l'immunité innée est également régulée durant la grossesse. Ainsi, les facteurs du complément qui pourraient reconnaître les cellules opsonisées sont inhibés *via* CD59 [743]. En l'absence de régulation du complément, une forte inflammation s'installe et conduit au

recrutement de neutrophiles et au rejet du fœtus. Ce mécanisme a notamment été observé dans un modèle murin déficient en Crry, un régulateur négatif du complément [744].

En conclusion, durant la grossesse, de multiples mécanismes immunosuppresseurs se mettent en place pour permettre au système immunitaire de ne pas rejeter le fœtus en développement. Toute perturbation de ce microenvironnement finement régulé pourrait favoriser le développement de pathologies de la grossesse et causer un rejet du fœtus. Cependant, les pathogènes qui infectent la mère peuvent accéder à ce microenvironnement déciduel immuno-modulateur et en abuser pour se multiplier tout en étant relativement protégé du système immunitaire.

III. Les infections virales par l'Hépatite E et Zika

A. Le virus de l'Hépatite E

Le virus de l'hépatite E (VHE) est un agent infectieux responsable d'atteintes hépatiques chez l'Homme. Il a été identifié en 1983 et défini comme étant un virus d'environ 30 nm responsable d'hépatites aiguës non A non B [745]. Le génome complet du virus a ensuite été caractérisé dans les années 1990 [746-748]. D'après l'Organisation mondiale de la santé, plus de 20 millions de personnes sont infectées par le VHE chaque année. Le taux de mortalité est estimé à 0,5-3% soit environ 70 000 morts par an [749].

1. Généralités sur le VHE

a. Génotypes viraux

Le génome du VHE est un ARN simple brin de polarité positive d'environ 7,2 kb [747]. Il appartient à la famille des *Hepeviridae*, subdivisée en deux genres : *Orthohepevirus* et *Piscihepevirus* [750]. Seuls les *Orthohepevirus A* infectent l'Homme. Les souches du genre *Orthohepevirus A* sont divisées en sept génotypes (VHE-[1-7]) qui infectent entre autres: l'Homme (VHE-1, -2, -3, -4 et -7), le porc (VHE-3 et -4), le lapin (VHE-3), le sanglier (VHE-3, -4, -5 et -6), et les camélidés (VHE-7) (**Figure 45**).

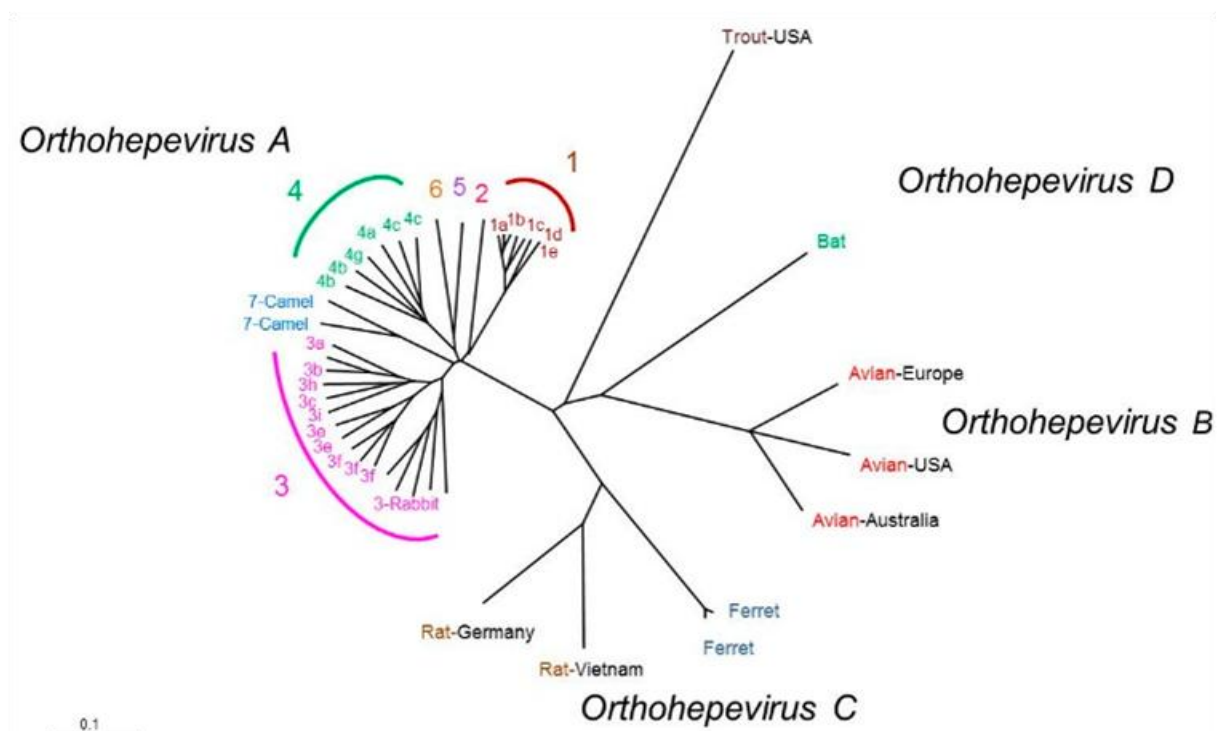


Figure 45 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences complètes du VHE. [751].

Parmi les virus infectant l'Homme, le VHE-1 et le VHE-2 sont strictement humains. Au contraire, les souches de VHE-3, VHE-4 et VHE-7 sont zoonotiques et peuvent se transmettre de l'animal vers l'Homme. De plus, au sein de chaque génotype, les différentes souches sont divisées en sous-types. Par exemple, le VHE-3 comprend dix sous-types : 3a à 3j [752]. De plus, comme pour de nombreux virus à ARN, le VHE est caractérisé par une variabilité génétique importante. Ainsi, l'activité de la polymérase virale s'accompagne d'un nombre élevé d'erreurs et de mutations qui génèrent un ensemble de variants viraux apparentés chez le même individu, nommé quasi-espèce virale [753,754]. L'ensemble des génotypes du VHE n'a, en revanche, qu'un seul sérotype.

b. Transmission du VHE

Les données épidémiologiques montrent une répartition géographique spécifique selon les génotypes du VHE (**Figure 46**). Il en va de même concernant les modes de transmission.

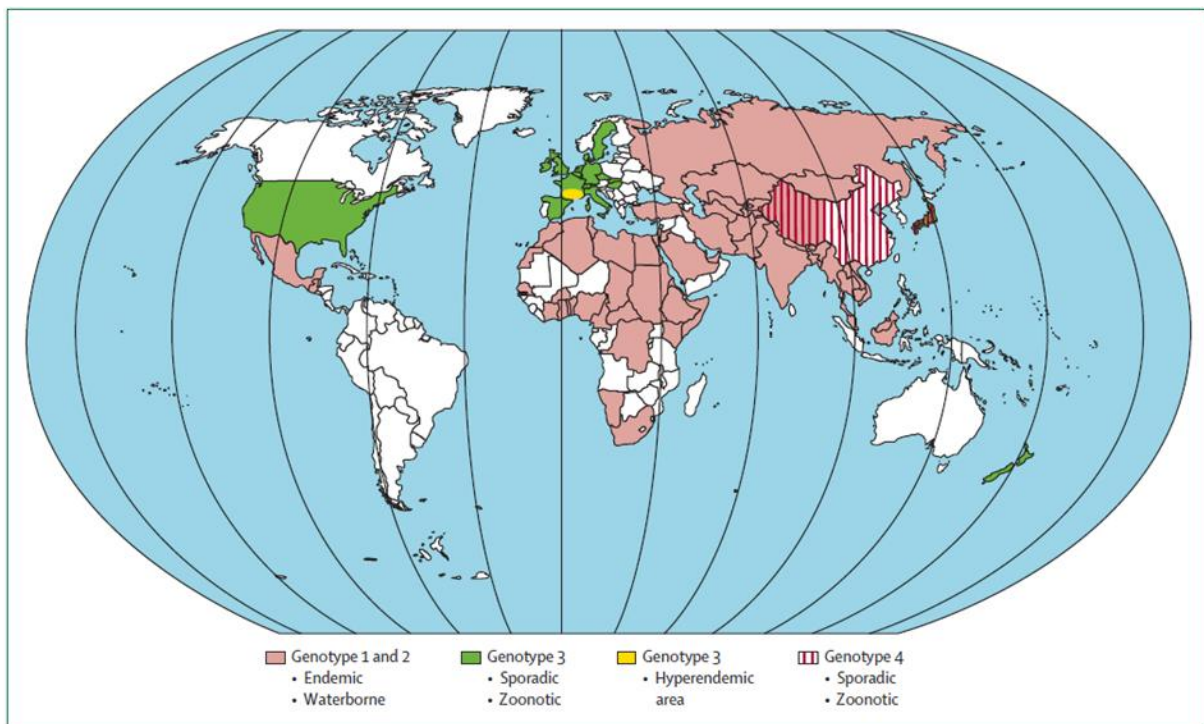


Figure 46 : Répartition géographique du VHE. [755].

Le VHE-1 et le VHE-2 sont retrouvés dans les pays en développement, majoritairement en Afrique et en Asie, et ont une séroprévalence de 10 à 40% [749]. Ils se transmettent par voie oro-fécale, principalement après exposition à des eaux contaminées [756]. Dans ces pays, le traitement des eaux est insuffisant et les eaux contaminées sont utilisées pour la consommation et pour les tâches domestiques courantes, augmentant fortement le risque de contamination. Ainsi, l'ARN du VHE a été détecté dans de nombreux échantillons d'eaux usées dans le nord de l'Inde [757].

Dans les pays développés, on trouve majoritairement le VHE-3 et le VHE-4. Le VHE-3 est notamment présent en Europe, en Amérique du Nord et en Océanie. Le VHE-4 est retrouvé en Asie de l'Est, principalement en Chine. En Europe, le VHE-3 est largement majoritaire et à une séroprévalence variant de 10 à 30% [755]. En France, la séroprévalence moyenne est de 22,4% mais varie de 8 à 86% selon les départements [758]. De plus, le sud-ouest de la France semble hyper endémique avec une séroprévalence supérieure à 50% chez l'adulte [759]. De manière intéressante, il semblerait que la prévalence augmente avec l'âge. Ainsi, elle est supérieure à 70% chez les personnes de plus de 58 ans.

Le VHE-3 et le VHE-4 se transmettent par voie zoonotique en raison d'un réservoir animal important. Les espèces porcines sont considérées comme le réservoir principal du VHE [760]. En effet, une forte prévalence d'infections asymptomatiques a été observée chez le porc [761]. Ainsi, la consommation de viande contaminée (porc, gibier, ...), peu ou pas cuite, serait la principale voie d'entrée du VHE-3 [762-764]. Une transmission par contact direct avec les animaux est également possible [765,766]. Concernant le VHE-7, une transmission par consommation régulière de lait et de viande de chameau a été prouvée chez un patient [767].

Le VHE peut également se transmettre par transfusion sanguine ou après transplantation d'organe. Cette transmission sanguine a initialement été décrite en Inde, puis a été observée dans les pays développés [768-770]. L'ARN du VHE a également été détecté dans des échantillons sanguins de plusieurs pays dont la France [771,772]. Enfin, le VHE peut également être transmis par la greffe d'un organe contaminé. Ainsi, une étude a rapporté la transmission virale lors de la transplantation d'un foie contenant l'ARN VHE [773]. Une autre étude a montré une transmission par transplantation rénale [774]. De plus, les greffes de moelle osseuse représentent également un risque de transmission [775].

Pour finir, le VHE peut être transmis de la mère à l'enfant durant la grossesse. Cette transmission verticale sera plus amplement détaillée ultérieurement.

c. Protéines virales du VHE

Le VHE est un virus ARN simple brin de 7,2 kb et de polarité positive. Son génome viral est composé de trois ou quatre (en fonction du génotype) cadres de lectures ouverts (Open Reading Frame, ORF) : ORF1, ORF2, ORF3 et ORF4 (**Figure 47**). L'extrémité 5' non codante contient une coiffe 7-méthylguanosine et l'extrémité 3' non codante contient une queue polyadénylée. Les séquences codantes pour ORF2/3 sont chevauchantes et les deux protéines sont issues du même ARN messenger bicistronique de 2,2 kb.

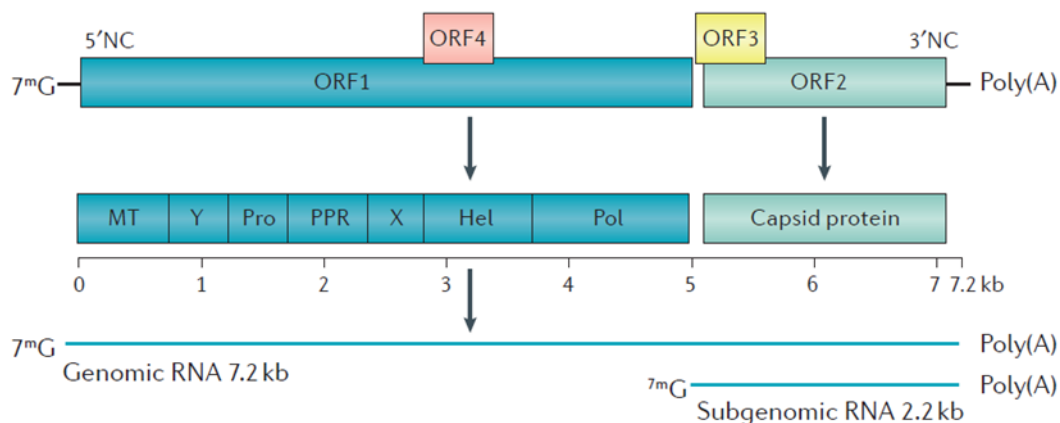


Figure 47 : Organisation du génome du VHE. [749].

ORF1 est situé à l'extrémité 5' du génome et code pour une polyprotéine qui contient les protéines non structurales du virus [776]. Parmi les différents domaines codés par ORF1, on trouve le domaine méthyltransférase (MT), Y, cystéine protéase (P), riche en proline (PPR), X, hélicase (Hel), et ARN polymérase ARN dépendante (RdRp). Le domaine MT catalyse la coiffe des ARN viraux, qui est indispensable pour la réplication du VHE *in vitro* [777,778]. Le domaine P a une activité cystéine protéase et pourrait être un antagoniste du facteur antiviral ISG15 [779]. Le PPR est une région hypervariable dont la longueur diffère en fonction des souches [780-782]. Sa délétion diminue l'infectivité et réduit la réplication du VHE [781,783]. Le domaine X est un macrodomaine dont la fonction n'est pas clairement définie. Il semble cependant pouvoir inhiber la réponse interféron et interagir avec le domaine MT et ORF3 [784,785]. Ainsi, le domaine X pourrait jouer un rôle dans la réplication virale et l'échappement aux réponses de l'hôte. Le domaine Hel code pour une hélicase qui catalyse l'ouverture de l'ARN viral lors de la réplication par un mécanisme ATP dépendant [776,786]. Elle possède également une activité 5'-triphosphatase impliquée dans le coiffage des ARN viraux [787]. Enfin, la RdRp est indispensable à la réplication virale [788]. Son expression a été localisée dans le réticulum endoplasmique, ce qui suggère qu'il pourrait être un site de réplication pour le VHE [789].

ORF2 code pour la protéine de capside, essentielle à la formation des virions [790]. L'assemblage des protéines ORF2 en capside confère une symétrie icosaédrique aux virions. Cette protéine de capside est impliquée dans l'interaction avec les cellules cibles et est immunogène [791]. La protéine ORF2 est divisée en trois domaines structuraux : un domaine S qui constitue la coque, un domaine intermédiaire M et un domaine protubérant P qui forme des spicules [792-794]. Ce sont majoritairement des épitopes du domaine P qui sont la cible des anticorps neutralisants [795]. Enfin, il a récemment été décrit l'existence de deux formes d'ORF2 (tronquées ou glycosylées) sécrétées par les cellules infectées, mais

qui ne sont pas associées à des virions infectieux et dont la fonction n'est pas connue [796]. Ces formes solubles sont également retrouvées dans le sérum de patients infectés.

ORF3 code pour une petite phosphoprotéine essentielle au bourgeonnement des virions par les cellules infectées [797]. Elle peut également interagir avec de nombreuses protéines cellulaires comme les microtubules du cytosquelette ou TSG101 (Tumor Susceptibility Gene 101), une protéine clé du transport endosomal [798]. De plus, il a récemment été montré qu'ORF3 est une viroporine qui forme un canal ionique membranaire essentiel à la production de particules virales infectieuses [799]. Enfin, elle permet au virus d'interférer avec des voies de signalisation et aurait un rôle immuno-modulateur en inhibant l'expression de gènes antiviraux [800].

La protéine ORF4 est une protéine récemment découverte et uniquement présente dans le VHE-1. Cette protéine est favorisée par le stress du réticulum endoplasmique et permet une meilleure réplication du VHE-1 dans les cellules humaines [801].

d. Structure du VHE

Le VHE est classiquement décrit comme un virus non enveloppé. Cependant, il existe également une forme quasi-enveloppée dans laquelle le virus s'associe à des lipides cellulaires. Cette particularité rapproche le VHE du VHA (Virus de l'Hépatite A) pour qui ce mécanisme était déjà connu [802]. En effet, il a été montré que les particules de VHA excrétées par les cellules possèdent une membrane lipidique d'origine cellulaire, proche des exosomes. L'acquisition de cette membrane est importante dans la physiopathologie de l'infection car elle permet au virus d'échapper aux anticorps neutralisants.

L'analyse sur gradient de sucrose du VHE produit *in vitro* a révélé la présence de particules de densité faible, identique à celle des particules retrouvées dans le sérum des patients [803]. Au contraire, les particules de VHE présentes dans les selles de patients ont une densité plus élevée [804]. La forme pseudo-enveloppée du VHE (VHE_E) est majoritaire dans le sang des patients. De plus, le traitement des VHE_E par des acides biliaires ou des détergents permet de dégrader cette pseudo-enveloppe et restore la sensibilité des particules virales aux anticorps neutralisants [804]. Enfin, comme les virus nus des selles ne peuvent pas être immuno-capturés par des anti-ORF3, il semblerait que seuls les virus enveloppés expriment la protéine ORF3 à leur surface [797]. Récemment, l'étude des exosomes produits par les cellules infectées a montré la présence d'ARN VHE encapsidés [805,806]. Ces formes enveloppées peuvent ainsi échapper aux anticorps neutralisants, même si leur infectivité est dix fois moins élevée que celle des virus nus [805].

Ainsi, les hépatocytes infectés produisent du VHE_E : (1) dans la circulation sanguine où cette forme persiste et (2) dans les canaux biliaires où, sous l'effet des sels biliaires et des

protéases, le virus perd progressivement son enveloppe lipidique [807]. Cette forme non enveloppée sera ensuite excrétée dans les selles.

e. Cycle réplcatif du VHE

Le cycle viral du VHE est mal connu et a peu été étudié du fait de la difficulté d'établir des systèmes d'infection *in vitro*. Il débute par l'entrée du virus dans l'hépatocyte *via* un récepteur d'entrée encore inconnu à ce jour (**Figure 48**). Il est cependant connu que, comme pour de nombreux virus, les héparanes sulfates favorisent l'entrée du virus [808]. La forme enveloppée pourrait utiliser des mécanismes d'entrée différents. Il a notamment été décrit qu'une voie clathrine/dynamine dépendante était impliquée dans l'endocytose du VHE_E [809]. Plus récemment, les GTPases Rab5 et Rab7 ont été décrites comme nécessaires à l'entrée du VHE_E [810].

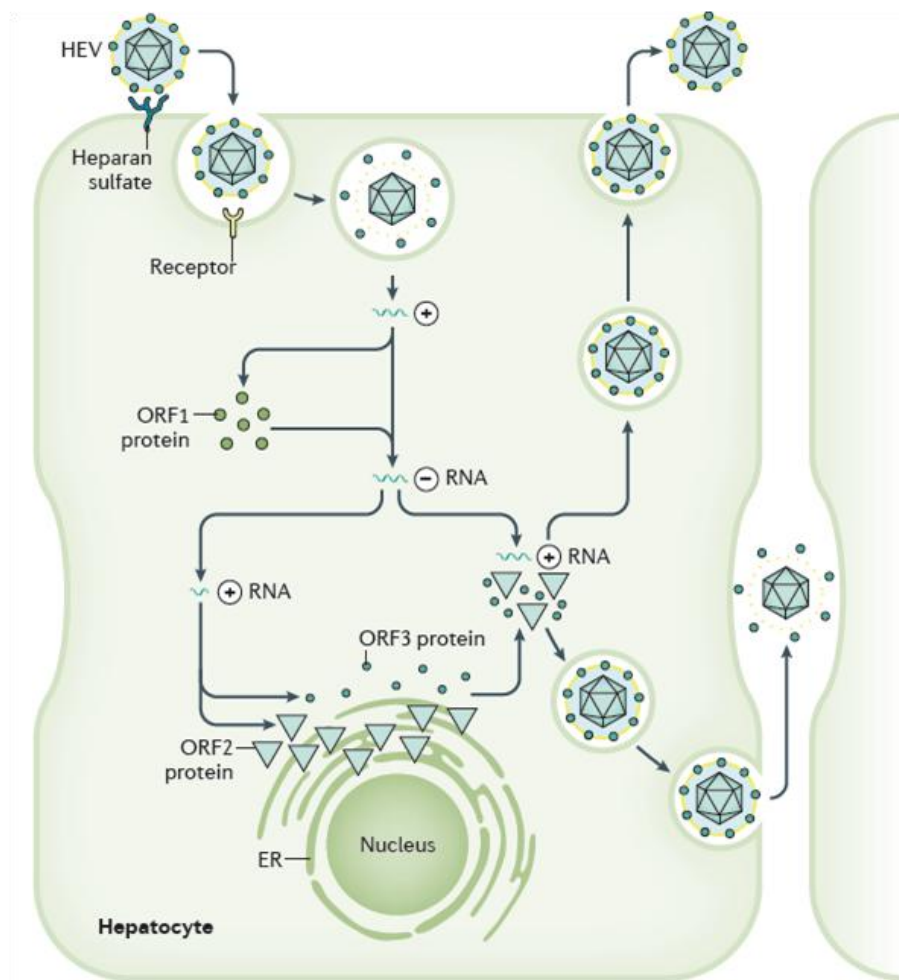


Figure 48 : Cycle réplcatif du VHE. [749].

Après son entrée dans la cellule, l'enveloppe du VHE_E est dégradée lors de l'acidification de l'endosome [810]. Dans le cytoplasme, la décapside des virions initie la réplcation virale. L'ARN viral simple brin de polarité positive permet la traduction de la polyprotéine ORF1, qui

servira de base pour la génération d'ARN intermédiaires de polarité négative *via* l'activité de la RdRp. Les ARN de polarité négative serviront ensuite de matrice pour la synthèse d'ARN complets de 7,2 kb ou d'ARN subgénomiques de 2,2 kb qui permettront la traduction des protéines ORF2 et ORF3 [811]. Les ARN complets seront encapsidés pour produire de nouveaux virions.

Les protéines qui permettent le transport intracellulaire et l'assemblage des virions ne sont que peu connues. Il a cependant été montré que la protéine Hsp90 est impliquée dans le transport de la protéine ORF2 [812]. De plus, ORF3 permet le bourgeonnement et la sortie des virions en interagissant avec le complexe cellulaire ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport), formant ainsi des complexes multivésiculaire [813].

2. Pathogenèse du VHE

a. Diagnostic

Le diagnostic de l'infection par le VHE se fait directement *via* la détection de l'ARN viral par qRT-PCR, ou indirectement *via* le dosage des IgM ou des IgG anti-VHE dans le sérum des patients (**Figure 49**). L'ARN viral et l'antigène de capsid sont détectables aux stades précoces de l'infection dans le sang [814]. De plus, le virus est également excrété dans l'urine et dans les selles [815]. La détection des IgM anti-VHE dans le sang est également la preuve d'une infection récente [749]. Cependant, chez les patients immunodéprimés, l'absence d'IgM ne permet pas d'exclure la possibilité d'une infection par le VHE et le diagnostic doit être confirmé en recherchant l'ARN viral dans le sang.

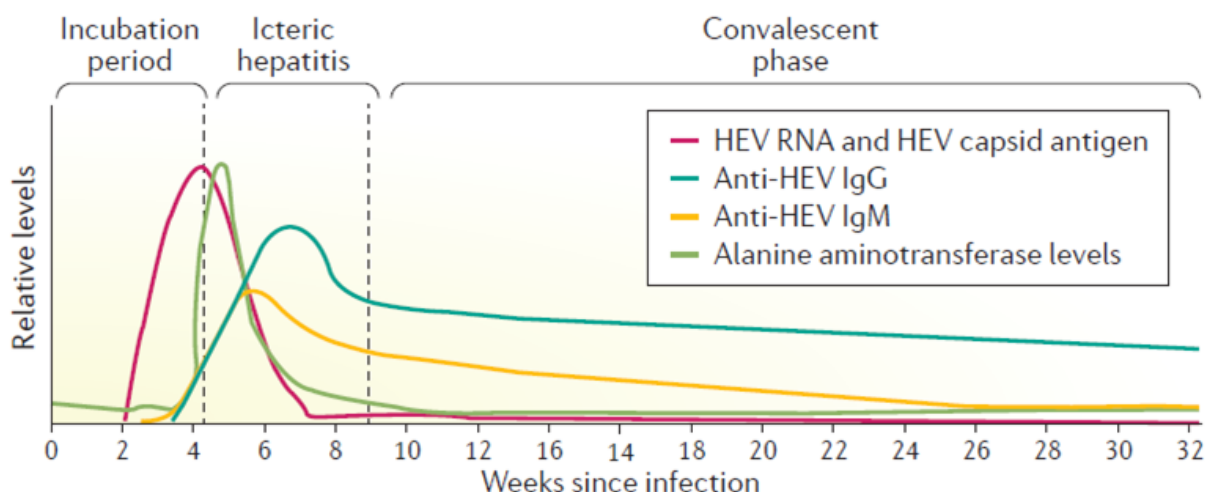


Figure 49 : Evolution des marqueurs sanguins durant l'infection VHE. [749].

b. Infection aiguë

L'infection aiguë par le VHE est majoritairement asymptomatique et spontanément résolutive en quelques semaines [816,817]. La période d'incubation dure du virus dure en général entre 2 et 6 semaines. Les symptômes observés lors de l'hépatite E aiguë peuvent être : des ictères muqueux, des urines foncées, des selles décolorées et des symptômes grippaux (fièvre, fatigue, vomissements, nausées, douleurs abdominales) [749]. En parallèle, le bilan hépatique montre une augmentation des ALAT/ASAT (Alanine/Aspartate Aminotransférases), des enzymes hépatiques dont la présence dans le sang est révélatrice d'une cytolysé hépatique [818]. L'ensemble des symptômes disparaîtra spontanément en quelques semaines, lorsque l'infection sera éliminée.

Une des particularités de l'infection aiguë par le VHE est sa prévalence plus importante chez les hommes, et tout particulièrement chez les personnes âgées [818]. Ainsi, la majorité des symptômes liés à l'infection sont détectés chez des patients de plus de 60 ans [819]. Cependant, les mécanismes qui sous-tendent cette pathogenèse exacerbée chez les personnes âgées ne sont pas connus. Une partie de mon travail de thèse s'est intéressée à l'implication de la réponse immune par les LT CD8 dans la sévérité de l'infection VHE chez les personnes âgées (Partie IV des Résultats).

c. Infection chronique chez l'immunodéprimé

Une infection chronique par le VHE peut survenir chez les patients immunodéprimés. Cette infection est caractérisée par la persistance de l'ARN du VHE dans le sang durant plus de trois mois [820]. Les hépatites chroniques ont principalement été décrites pour le VHE-3 mais il a également été observé des infections chroniques par le VHE-4 [821,822].

Il a ainsi été montré une persistance du VHE chez des patients atteints du VIH ou d'hémopathies malignes [823-825]. De plus, de nombreux cas d'infections chroniques chez des patients transplantés d'organes solides ont également été décrits [820,826]. Suite à une infection aiguë par le VHE, environ 1/3 des patients va éliminer spontanément le virus alors que 2/3 des patients vont développer une hépatite E chronique [827]. Environ 10% des patients chroniques vont ensuite développer une cirrhose qui peut être fatale. Enfin, après plusieurs années, cette cirrhose peut progresser en hépatocarcinome.

Concernant le traitement de l'infection chronique, il est premièrement recommandé de réduire l'immunosuppression chez les patients dès que possible. Dans 1/3 des cas, cette première mesure est suffisante pour éliminer le virus [827,828]. Si l'infection persiste, le patient sera mis sous thérapie antivirale. L'utilisation de la ribavirine en monothérapie par voie orale est actuellement le traitement recommandé pour les patients infectés chroniquement par le VHE. Il a été montré que 600 mg de ribavirine par jour pendant trois

mois permet l'éradication virale dans 78% des cas [829]. En cas de rechute, six mois de traitement supplémentaires permettent la clairance virale dans certains cas. Enfin, un traitement de trois mois par l'IFN- α pégylé favorise également l'élimination du virus [830,831].

Les mécanismes d'action de la ribavirine sont mal connus mais il est supposé qu'elle pourrait agir directement en inhibant la réplication virale ou indirectement en influençant les réponses de l'hôte [832]. *In vitro*, il a été montré que la ribavirine permet d'inhiber la réplication du VHE-1 et du VHE-3 en déplaçant le pool de GTP intracellulaire des cellules infectées [833]. Elle a également un effet mutagène qui pourrait inhiber la réplication du VHE en favorisant la production de particules virales défectives [834]. Enfin, elle peut agir en synergie avec l'acide mycophénolique (traitement immunosuppresseur agissant sur la synthèse des purines) pour inhiber la réplication du VHE *in vitro* ([835].

d. Manifestations extra-hépatiques du VHE

En plus de son atteinte hépatique, l'infection par le VHE est associée à de nombreuses manifestations extra-hépatiques. Ces manifestations sont soutenues par des études *in vitro* qui ont décrit l'infectiosité du VHE dans des cellules rénales, intestinales ou neuronales [836-838]. De plus, des pathologies neurologiques telles que le syndrome de Guillain-Barré ou de Parsonage Turner (amyotrophie névralgique de l'épaule) peuvent être induites par le VHE [839]. L'ARN du VHE a également été détecté dans le liquide céphalo-rachidien d'un patient souffrant de neuropathies [840]. Enfin, d'autres manifestations extra-hépatiques telles que des atteintes rénales, des cryoglobulinémies et des atteintes hématologiques (thrombocytopénies, ...) ont aussi été décrites [841-843].

En plus de toutes ces manifestations, une atteinte placentaire du VHE durant la grossesse à été décrite comme responsable de nombreux cas d'hépatites fulminantes (insuffisances hépatiques aiguës) et de pathologies de la grossesse.

3. Pathogenèse du VHE durant la grossesse

Durant la grossesse, l'infection par le VHE peut avoir des conséquences graves et pose un réel problème de santé publique dans les pays en développement. Dans ces pays, l'infection par le VHE est responsable de complications graves affectant la mère (hépatites fulminantes, hémorragies, pré-éclampsie) mais aussi le fœtus [844]. Le virus est responsable de plus de 3000 morts fœtales par an, additionnées à de nombreux cas de mort *in utero* dus au décès de la mère [817,845]. De plus, en comparaison aux autres hépatites virales, l'infection par le VHE est associée à une fréquence plus importante d'hépatites fulminantes [846,847]. Ainsi, de nombreuses études (majoritairement réalisées en Inde) ont montré que

l'infection par le VHE durant la grossesse est responsable d'un taux de mortalité de plus de 40% avec une prévalence d'hépatite fulminante très élevée [745,845,848-850].

Les premiers symptômes de l'infection par le VHE durant la grossesse sont similaires à ceux observés durant les infections aiguës (ictère, syndrome grippal, ...). Cependant, après un court délai, ces manifestations cliniques évoluent vers une insuffisance hépatique aiguë qui peut ensuite causer une CIVD (Coagulation Intravasculaire Disséminée), une encéphalopathie et un œdème cérébral dans 70% des cas [851]. Le coma hépatique est une des complications les plus fréquentes et à un taux de mortalité de 100% [852]. L'analyse histologique du foie des patients, décédés à la suite d'une hépatite E fulminante, a révélé la présence d'une inflammation hépatique et d'une nécrose tissulaire [853]. De plus, les patientes enceinte faisant une hépatite E fulminante ont une augmentation du niveau plasmatique de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF- α , CCL-4, ...) ainsi qu'une augmentation du nombre de LT CD8, notamment au niveau du foie [854-859]. Cette accumulation de facteurs solubles pourrait participer à l'exacerbation de la pathologie.

La transmission verticale du virus de la mère vers le fœtus a été démontrée avec un taux allant de 50 à 100%, selon les études [860-862]. Le fait que le VHE ait été retrouvé dans le cordon ombilical et puisse se répliquer dans le placenta (ARN négatif et protéine ORF3) suggère une transmission virale trans-placentaire [863,864]. Il a été montré que les femmes infectées par le VHE avaient une charge virale plus élevée lorsqu'elles étaient enceinte [865]. De plus, en fonction de la sévérité des symptômes et de la charge virale, une mortalité de fœtale et/ou maternelle peut survenir, en particulier durant le troisième trimestre de grossesse [866]. Ainsi, un accouchement prématuré, un retard de croissance et la mort du fœtus ou du nouveau-né sont observés dans 25 à 50% des cas [851,852,867,868].

De manière intéressante, une étude à montré qu'en Egypte, le VHE n'était associé à aucune complication durant la grossesse [869]. Les raisons expliquant cette pathogénèse réduite ne sont pas connues mais les auteurs ont suggéré qu'une exposition précoce au VHE durant l'enfance favoriserait la mise en place d'une réponse anticorps protective. Le fait que la prévalence des anticorps anti-VHE soit très élevée dans la population totale (>80%) supporte cette possibilité.

De manière systématique, l'ensemble des complications décrites durant la grossesse est causé par le VHE-1. Il n'existe, à ce jour, aucune donnée sur des complications causées par les autres génotypes durant la grossesse. Les seuls cas référencés dans la littérature concernent des femmes enceintes infectées par le VHE-3 [870,871]. Plus récemment, un cas d'infection chronique par le VHE-3 chez une femme enceinte sous immunosuppresseurs a également été décrit [872]. Dans l'ensemble des cas, l'infection par le VHE-3 a été

éradiquée et n'a eu aucune conséquence délétère sur la mère et le bébé. Ainsi, le VHE-1 et le VHE-3 ont des conséquences diamétralement opposées durant la grossesse. Les mécanismes qui sous-tendent la pathogénicité différentielle du VHE-1 et du VHE-3 durant la grossesse ne sont pas connus. La différence pourrait être liée au mode de vie (pays riches vs pays émergents) mais également aux souches virales (VHE-1 vs VHE-3). Dans la première partie de ma thèse, nous avons étudié la susceptibilité de tissus maternels et fœtaux au VHE-1 et VHE-3 et avons caractérisé les conséquences de cette infection (Partie I des Résultats).

4. La réponse immunitaire contre le VHE

Les réponses immunitaires contre le VHE sont mal connues, même si la survenue d'infections chroniques chez les patients immunodéprimés suggère qu'elles sont importantes pour contrôler l'infection. Comme pour les autres hépatites virales, le VHE n'est pas un virus cytolytique [873]. Cela suggère que les dégâts hépatiques observés lors de l'infection sont liés par des mécanismes immunitaires lytiques de l'immunité innée et adaptative.

a. Réponse innée contre le VHE

- Réponse antivirale

L'infection des cellules par le VHE induit une première ligne de réponse *via* les PRR de type RLR (RIG-1 Like Receptors) et de type TLR, qui reconnaissent les ARN viraux (**Figure 50**). L'activation de ces voies cellulaires déclenche la production d'IFN de type I et III qui stimulent les ISG et favorisent les réponses antivirales pro-inflammatoires [874]. Ainsi, l'activation des ISG dans les cellules infectées permettra une action autocrine et paracrine qui potentialisera la réponse antivirale.

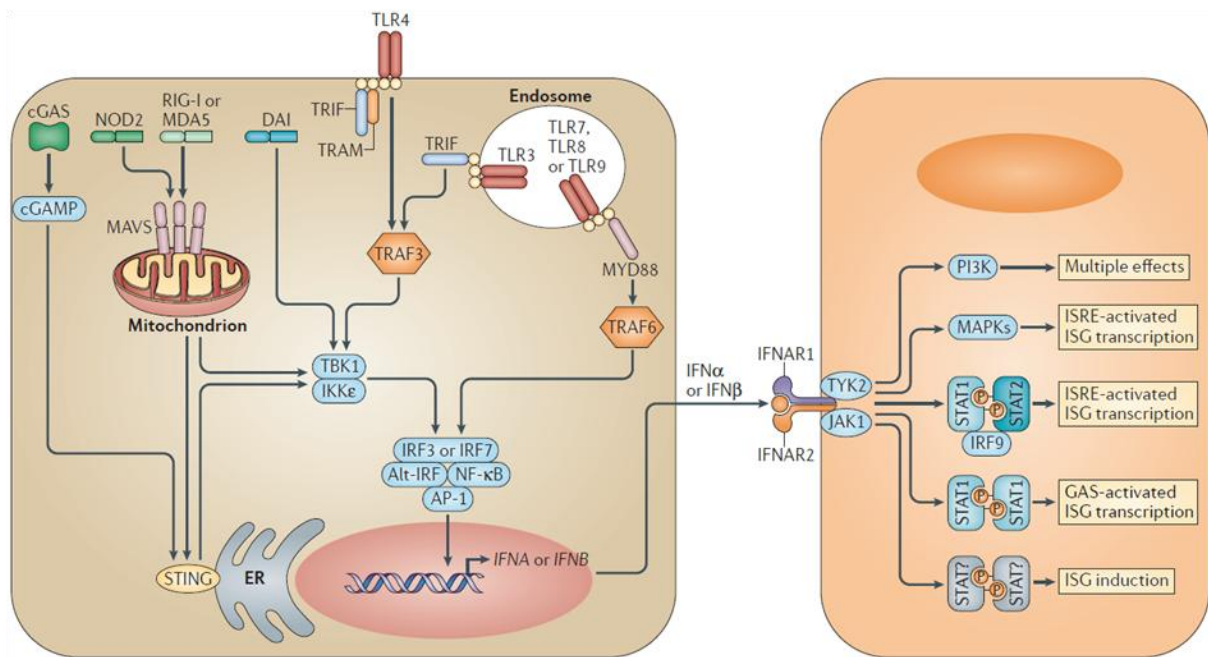


Figure 50 : Voies d'induction des IFN de type I. [874].

Les RLR reconnaissent l'extrémité triphosphate des ARN courts et doubles brins. Ils regroupent les récepteurs RIG-I (Retinoic acid Inducible Gene-I) et MDA5 (Melanoma Differentiation Associated protein 5) qui ont une localisation cytoplasmique. Leur activation induit une cascade de signalisation intracellulaires et le recrutement de protéines adaptatrices telles que MAVS (Mitochondrial Antiviral Signaling protein) et TRAF (TNF Receptor Associated Factor). La protéine MAVS est associée à la membrane externe des mitochondries et joue un rôle central dans ces voies d'activation. Elle va ainsi permettre la phosphorylation d'IRF3 et sa translocation nucléaire pour activer la transcription de l'IFN.

Le rôle de RIG-I durant l'infection par le VHE a été montré par plusieurs études. Il a ainsi été montré que l'infection par le VHE augmente le niveau de transcription de RIG-I [875]. De plus, l'inhibition de RIG-I ou d'IRF3 augmente l'infectiosité et la production virale du VHE [876]. La protéine ORF3 peut également induire la production d'IFN-β *via* RIG-I [784]. Enfin, il semblerait que RIG-I puisse avoir une action antivirale contre le VHE de manière IFN-indépendante, ce qui suggère l'existence de voies alternatives [877]. En plus de RIG-I, il a également été suggéré qu'IRF1 pourrait participer au contrôle de l'infection par le VHE. Ce rôle a été suggéré par une étude qui a montré l'effet antiviral de la surexpression *in vitro* d'IRF1 [878]. Ainsi, IRF1 induit la transcription de STAT1, qui s'active et forme un complexe avec STAT2 et IRF9 pour induire l'expression des ISG.

Un autre récepteur impliqué dans la reconnaissance des ARN viraux est le TLR3. Sa voie de signalisation implique les molécules TRIF (TIR domain containing adapter inducing IFN beta) et conduit à l'activation d'IRF3 et conduit à la production de cytokines pro-inflammatoires

comme l'IL-6 ou le TNF- α (**Figure 50**). Il a été montré que le niveau de ces cytokines est plus élevé chez les patients infectés par le VHE en phase aigüe [879,880]. Cette production a également été confirmée *in vitro* en utilisant du VHE infectieux ou inactivé par les UV [875]. De manière intéressante, cette étude a également montré que l'infection par le VHE induit une surexpression du TLR2 et du TLR4, qui reconnaîtraient un motif peptidique présent sur la capsid [875]. Enfin, le rôle des TLR semble important pour la pathogenèse du VHE chez la femme enceinte. Il a en effet été montré que les femmes enceintes ayant une hépatite fulminante présentent une réduction du niveau d'expression et de la signalisation par les TLR3 et TLR7 [881].

Comme décrit précédemment dans les mécanismes de défense du placenta (Partie I.G.2 de l'Introduction), la signalisation par les IFNAR permet l'expression de nombreux ISG (**Figure 12**). Une telle augmentation des ISG a également été détectée chez des patients infectés et dans un modèle murin [882,883]. Il semblerait cependant que, par comparaison au VHC, le VHE soit peu sensible aux IFN de type I [884,885]. Cette résistance pourrait s'expliquer par le fait que le VHE inhibe la signalisation par l'IFN- α [886]. De plus, il a été montré que l'ajout d'IFN-I exogènes n'augmente pas la phosphorylation de STAT1, ce qui pourrait également expliquer la résistance du VHE aux IFN de type I [876]. Enfin, une étude récente a montré la phosphorylation et donc l'activation de STAT1 dans des biopsies hépatiques de patients VHE [887]. Cette étude a également révélé que l'ARN du VHE induit une forte réponse IFN- β *via* in PRR non déterminé mais qui implique IRF3, IRF7 et la voie JAK-STAT.

Concernant les IFN de type III, il a récemment été montré que leur expression est corrélée à la reconnaissance du VHE par RIG-I et la voie MAVS [876]. Ainsi, en réponse à l'infection par le VHE, les cellules produisent de l'IFN de type III. De plus, l'ajout d'IFN- λ ($\lambda 1$ et $\lambda 2$) dans le milieu de culture permet d'inhiber la production virale. Cette inhibition ne permet cependant pas d'inhiber la totalité du virus.

- Réponse cellulaire

Les cellules NK et NKT (Natural Killer T) sont des effecteurs cytotoxiques de l'immunité innée qui sont capables d'être recrutées localement et de lyser les cellules infectées. De plus, les cellules NK représentent la population immune majoritaire du foie, faisant d'elles des effecteurs potentiels de la réponse anti-VHE [888]. Cependant, malgré la pertinence du sujet, il n'existe que peu d'études sur le rôle de la réponse cellulaire immune. Il a été montré que les cellules NK, dans le sang de patients en phase aigüe, étaient plus activées et en nombre moins important, suggérant alors un recrutement hépatique [889]. Enfin, un enrichissement en cellules CD56⁺ (NK ou NKT) a été observé dans le foie de patients infectés par le VHE en comparaison à d'autres hépatites virales [858].

b. Réponse adaptative contre le VHE

- *Réponse anticorps*

Une réponse sérologique anti-VHE est généralement détectable chez les patients infectés. Les IgM sont les premiers isotypes à apparaître. Les IgG anti-VHE apparaissent plus tardivement, persistent durant plusieurs années et sont considérées comme protectrices. Le risque de réinfection après une première réponse sérologique reste cependant mal connu même si des réinfections ont été observées chez des patients transplantés ayant un titre d'IgG inférieur à 10 UI/mL [890].

- *Réponse par les LT*

Les réponses spécifiques par les LT ont peu été étudiées dans le contexte du VHE. En effet, les peptides immunogènes du VHE ne sont pas connus, rendant ainsi impossible le développement de tétramères ciblant les LT spécifiques du virus. Ainsi, l'étude des réponses spécifiques du VHE se fait en utilisant des pools de peptides dérivés d'ORF2 et/ou d'ORF3.

Lors de la phase aigüe, une augmentation du nombre de LT CD8 a été observée chez les patients infectés ([891]. De plus, après stimulation par ORF2 et ORF3, un nombre plus important de cellules produit de l'IFN- γ . Cette augmentation d'IFN- γ a également été observée dans un modèle de primate en phase aigüe du VHE [892]. Une autre étude a observé une fréquence plus élevée de LT CD8 et proportion plus importante de LT activés (exprimant CD38 et CD69) chez des patients en phase aigüe par comparaison à des patients ayant résolu l'infection [893]. De plus, en analysant des biopsies de patients ayant eu une hépatite fulminante causée par le VHE, un fort recrutement de LT CD8 a été observé [858]. L'ensemble de ces études suggère un rôle important des LT CD8 et de l'IFN- γ dans le contrôle de l'infection par le VHE. Le rôle précis des différentes sous-populations reste cependant à déterminer.

L'importance des LT dans la réponse anti-VHE est soulignée par la persistance virale chez les patients immunodéprimés. Des études chez les patients transplantés ont notamment montré que le passage vers la chronicité est associé à un taux de LT plus bas que chez les patients qui éliminent le virus [826,827]. De plus, les patients qui évoluent vers la chronicité ont une réponse IFN- γ anti-VHE et un taux de TNF- α dans le sérum plus faible que les patients qui guérissent spontanément [754].

Une autre étude a montré que les patients atteints de VHE chronique ont un défaut de réponse LT spécifique [894]. En utilisant une stimulation par les pools de peptides VHE, ils ont montré que les LT CD4 et CD8 ont un défaut de prolifération et de production de cytokines. De plus, une réponse de type Th2 et une production d'IL-10 sont associées à la

persistance virale. De manière intéressante, la fonction des LT spécifiques du VHE pouvait être restaurée en utilisant de la ribavirine ou en bloquant les récepteurs inhibiteurs PD-1 et CTLA-4 [894]. Plus récemment, une étude s'est intéressée à étudier la réponse des LT chez des patients immunocompétents et transplantés à différents stades de l'infection [895]. A la différence de l'étude précédente, ils ont n'ont pas montré de différence de réponse entre les LT de patients chroniques et résolutifs. Ils ont cependant confirmé le faible pourcentage de LT spécifiques du VHE (majoritairement d'ORF2) et le fait que les patients immunocompétents ont des réponses plus fortes (0,4% de LT CD8 spécifiques en moyenne).

Ainsi, l'élimination du VHE nécessite une réponse T (majoritairement LT CD8) efficace. Tout défaut de cette réponse, qu'il soit quantitatif (nombre de cellules) ou qualitatif (réponse IFN- γ et TNF- α) peut favoriser la persistance virale et participer au passage vers la chronicité chez les patients immunodéprimés. En revanche, les conséquences de tels défauts chez des patients immunocompétents ne sont pas connues.

5. Les modèles d'infection par le VHE

a. Modèles cellulaires *in vitro*

Le VHE est un virus difficile à amplifier en culture et, pendant longtemps, aucun modèle ne permettait la propagation du virus *in vitro*. Les premiers modèles mis en place étaient des hépatocytes primaires de macaques et des lignées tumorales épithéliales [896-898]. Ces modèles étaient cependant associés à une faible production virale.

L'amélioration de la propagation *in vitro* a ensuite été optimisée en identifiant des lignées plus permissives au VHE et des souches virales qui se répliquent mieux. Il a ainsi été découvert que les lignées tumorales PLC/PRF/5 (hépatocarcinome) et A549 (adénocarcinome pulmonaire) permettent une réplication plus efficace du virus [873]. Il faut cependant attendre plus de cinquante jours pour obtenir un fort titre viral. De plus, de nombreux passages sont nécessaires pour adapter le virus et le rendre plus infectieux *in vitro* [873,899]. Concernant le virus, la souche Kernow-C1 du VHE-3 a été isolée chez un patient chronique co-infecté par le VIH [900]. Il a été montré que, après six passages, cette souche a acquis une insertion humaine au niveau de la région PPR qui lui confère un avantage réplcatif. De telles insertions ont également été décrites dans d'autres souches virales mais également chez des patients transplantés infectés chroniquement [901,902].

Actuellement, les lignées humaines d'hépatocarcinomes telles que HepG2/C3A, Huh7 ou Huh7.5 sont les modèles les plus utilisés. L'infection de ces cellules par le virus Kernow-C1 a permis une réplication virale 7,5 fois supérieure par rapport aux lignées PLC/PRF/5 et A549

[900]. De plus, la délétion de gènes important pour la réponse IFN (MAVS, RIG-I, MDA5) permet de rendre ces cellules encore plus permissives au virus [876]. Enfin, de nouveaux modèles d'hépatocytes dérivés de cellules souches ont récemment été développés et pourraient permettre l'étude de la pathogenèse du VHE dans des conditions plus physiologiques [903,904].

Le seul modèle permettant l'étude du VHE durant la grossesse est basé sur l'utilisation de lignées de choriocarcinomes (JEG et JAR) [905]. Dans une des axes de recherche de ma thèse, nous avons mis au point de nouveaux modèles, basés sur l'utilisation d'explants *ex vivo* et de cellules stromales dérivées de la décidua et du placenta, pour étudier la pathogenèse du VHE à l'interface mère-fœtus (Partie I des Résultats).

b. Modèles animaux

Les modèles animaux permettent d'explorer la pathogenèse du VHE *in vivo*. Des modèles de primates non humains ont notamment utilisés pour étudier les conséquences virologiques et la réponse de l'hôte durant l'infection par le VHE [777,906-908]. Ces modèles sont cependant coûteux et difficile à mettre en place. De plus, ils ne permettent pas de reproduire la pathogenèse exacerbée du VHE durant la grossesse [909].

Le lapin est un hôte naturel du VHE pour lequel des infections chroniques par le VHE-3 ont été décrites [910]. Le lapin est un modèle intéressant pour étudier les conséquences de l'infection lors de la grossesse. En effet, il a été montré que les lapines gravides infectées par une souche lapin du VHE ont une mortalité d'environ 20% et une réplication virale au niveau du placenta [911]. Cependant, les différences de placentation entre le lapin et l'Homme rendent difficile l'étude des conséquences fonctionnelles de l'infection durant la grossesse.

Le porc est un autre hôte du VHE-3 et du VHE-4 chez qui l'infection est majoritairement asymptomatique, même si des souches humaines peuvent induire des lésions hépatiques [912]. Il a récemment été utilisé comme modèle pour mimer l'infection chronique par le VHE : (1) grâce à des traitements immunosuppresseurs et (2) dans un modèle de co-infection par le virus du syndrome dysgénésique et respiratoire du porc [913,914].

Enfin, la souris est un modèle difficilement utilisable car elle n'est pas un hôte naturel du VHE [915]. Une alternative pour contourner ce problème a été l'utilisation de souris immunodéficiences « humanisées » à qui l'on greffe des hépatocytes humains dans le foie. En utilisant ce modèle, il a été démontré que les souris deviennent infectables par le VHE-1 et le VHE-3 et développent une infection chronique [883,916]. De manière intéressante, l'infection par le VHE est uniquement dépendante des hépatocytes humains greffés car les tissus murins restent réfractaires à l'infection [917].

B. Le virus Zika

Le virus (ZIKV) est membre de la famille des *Flaviviridae* qui appartient au genre *Flavivirus*. C'est un virus à ARN simple brin de polarité positive enveloppé [918]. Le genre *Flavivirus* regroupe également d'autres virus tels que le virus de la dengue (DENV), le virus de la fièvre jaune et le virus du Nil occidental.

1. Découverte et propagation du virus Zika

Le ZIKV a été initialement découvert dans le sang d'un macaque rhésus de la forêt Ziika en Ouganda en 1947 [919,920]. Le virus n'a ensuite été associé qu'à des cas sporadiques jusqu'à sa réémergence dans les années 2000 [921]. En 2007, une première épidémie de ZIKV a été rapportée en Micronésie (Pacifique Nord) et a causé environ 5000 cas d'infections **(Figure 51)** [922]. Six ans après, une deuxième épidémie a touché la Polynésie Française et les îles du Pacifique entre 2013 et 2014, causant environ 30 000 cas d'infections [923]. Enfin, le virus a atteint l'Amérique du Sud et tout particulièrement le Brésil en 2015, où il a causé une pandémie responsable de plus de 200 000 cas d'infection entre 2015 et 2017.

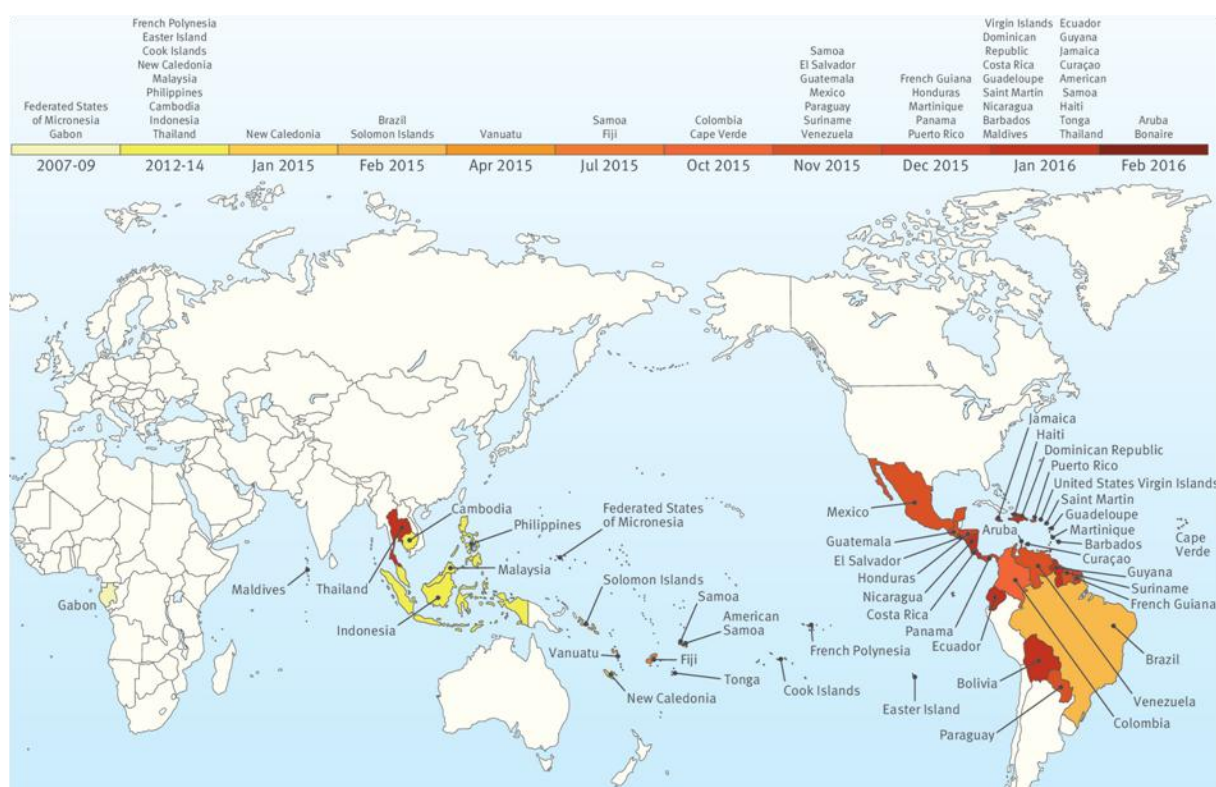


Figure 51 : Propagation du virus Zika. [924].

C'est durant cette pandémie que de nombreuses complications durant la grossesse, telles que des avortements, des syndromes de pré-éclampsie, des retards de croissance *in utero*

et des défauts neuro-développementaux (microcéphalie) [925]. De plus, les complications sont plus sévères si la mère est infectée durant le premier trimestre de grossesse. En se basant sur des analyses phénotypiques, le ZIKV a été divisé en deux souches principales : une souche Africaine et une souche Asiatique [926]. De manière intéressante, il semblerait que seule la souche Asiatique du ZIKV soit capable d'induire les défauts neuro-développementaux et de causer les complications durant la grossesse [927]. L'apparition de mutations favorisant le tropisme neuronal de ZIKV dans la souche Asiatique pourrait permettre d'expliquer cette dichotomie [928].

2. Réplication du génome viral

Le génome du ZIKV est composé d'une molécule d'ARN simple brin de polarité positive d'environ 11 kb qui code pour une seule ORF flanquée de régions 5' (coiffée) et 3' non codantes (**Figure 52**). L'ARN viral de polarité positive sera ensuite transcrit en une large polyprotéine qui sera ensuite clivée par les protéases de l'hôte et du virus au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique. Ce clivage va permettre la formation de 3 protéines structurales (C, PrM et E) et 7 protéines non structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5). La protéine NS3 possède une activité protéase qui participera également au clivage de la polyprotéine.

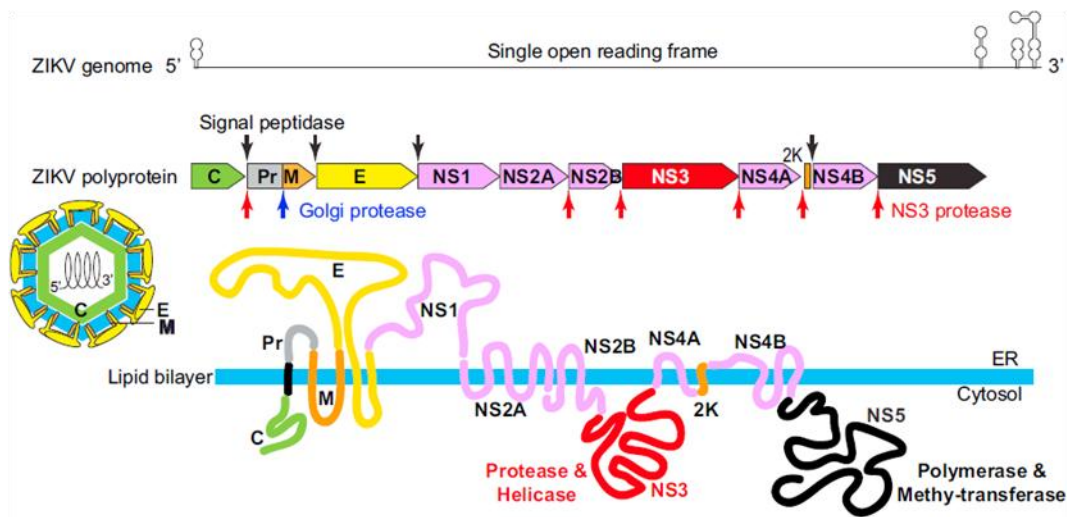


Figure 52 : Organisation du génome viral du ZIKV. [918].

La réplication du ZIKV se déroule, comme pour le DENV, dans des « usines de réplication » résultant de l'invagination du réticulum endoplasmique [929,930]. L'ARN du ZIKV sera transcrit en ARN de polarité négative qui servira de matrice pour l'amplification du génome viral [931]. Cette étape nécessite l'activité ARN polymérase ARN dépendante de la protéine NS5, mais aussi l'activité hélicase de la protéine NS3. La protéine de capsid (C) s'associe au génome viral pour former la nucléocapside [932]. Cette nucléocapside est ensuite

recouverte d'une enveloppe composée d'une bicouche lipidique (dérivée de la cellule hôte) dans laquelle s'insèrent les protéines virales PrM et E [933]. La protéine d'enveloppe (E) est responsable de la reconnaissance des récepteurs d'entrée du virus et permet la fusion du ZIKV avec la cellule cible. La protéine PrM agit comme une protéine chaperonne qui prévient l'action prématurée de la protéine E [934]. L'assemblage du virus se produit au niveau du réticulum endoplasmique. Les nouveaux virions sont ensuite transportés dans l'appareil de Golgi où la protéine PrM est clivée en protéine M par une protéase de type furine [935]. Ce clivage permet la maturation du virion qui devient compétent pour la fusion et sort de la cellule par exocytose.

3. Transmission du ZIKV

Le ZIKV est un arbovirus qui se transmet principalement lors de la piqûre par un insecte infecté, mais également dans le cadre de relations sexuelles et de transfusion sanguine. De plus, la transmission verticale du virus de la mère vers le fœtus a également été prouvée.

a. Transmission vectorielle

Le ZIKV est un virus transmis par les moustiques du genre *Aedes*, principalement au niveau des aires urbaines. De nombreux autres pathogènes peuvent également être transmis par ce moustique et il a été montré que *Aedes aegypti* peut simultanément transmettre le ZIKV, le DENV mais aussi le virus chikungunya [936]. De plus, la quasi-totalité des régions tropicales et subtropicales (représentant 3,5 milliards de personnes) sont infestées par de nombreuses espèces du genre *Aedes* [937]. La transmission du ZIKV n'a cependant été reportée « que » dans 84 pays. Enfin, d'autres espèces de moustique pourraient également participer à la transmission du ZIKV. Les moustiques du genre *Culex* ont été suggérés comme vecteurs potentiels du ZIKV mais d'autres études sont en désaccord avec cette hypothèse [938,939].

b. Transmission sexuelle

La transmission sexuelle ZIKV a été suspectée dès 2008, lorsqu'un scientifique infecté au Sénégal a transmis le virus à sa femme à son retour aux Etats-Unis mais aussi en 2013, après la détection de particules virales dans le sperme d'un patient Polynésien [940,941]. Durant la pandémie de 2015, le ZIKV a également été détecté dans le sperme d'un patient Français revenant de régions endémiques [942]. De plus, il a été montré que le virus persiste dans le sperme pendant plus de 150 jours et est retrouvé dans les spermatozoïdes [943].

La transmission sexuelle par le ZIKV a depuis été documentée dans de nombreux cas, lorsque des personnes vivant dans des zones non-endémiques ont été infectées après avoir eu des rapports sexuels avec des partenaires revenant de zones endémiques. Ainsi, la

transmission sexuelle est possible par voie génitale, anale ou orale et peut se faire d'homme à femme, de femme à homme et d'homme à homme [944]. De plus, la transmission sexuelle peut avoir lieu plus de quarante jours après l'apparition des symptômes. La durée exacte de l'infectivité du ZIKV dans les fluides génitaux n'est cependant pas connue.

Les effets du ZIKV sur la fertilité masculine ne sont pas connus et les données de la littérature sont contradictoires quant à l'effet du virus sur l'appareil reproducteur. Dans un premier temps, il a été montré dans un modèle murin que le ZIKV infecte les testicules et endommage sévèrement l'architecture tissulaire [945]. Une étude plus récente, utilisant des explants *ex vivo* de testicules humains, a confirmé l'infectivité du tissu mais n'a cependant observé aucune altération tissulaire [946].

Enfin, même si la transmission sexuelle du ZIKV peut contribuer à la propagation du virus dans les zones non-endémiques, la transmission par le moustique reste majoritaire. Cependant, à cause de l'infestation par les moustiques, il n'est pas possible d'estimer l'importance réelle de la transmission sexuelle dans les zones endémiques.

c. Transmission sanguine

La possibilité de transmission du ZIKV par transfusion sanguine a été suggérée en Polynésie Française après que l'ARN viral ait été détecté dans 2,8% des donneurs de sang asymptomatiques [940]. Ce mode de transmission a été confirmé durant l'épidémie de 2016 au Brésil [947]. Cependant, comme pour la transmission sexuelle, il est difficile d'estimer le nombre réel de cas dans les régions endémiques.

d. Transmission materno-fœtale

La transmission périnatale du ZIKV a été décrite pour la première fois durant l'épidémie en Polynésie Française [948]. En revanche, c'est pendant l'épidémie Brésilienne que la transmission intra-utérine du ZIKV a été observée [949,950]. La présence de l'ARN viral a ensuite été confirmée dans le liquide amniotique mais aussi dans le cerveau fœtal et dans les produits de fausse-couche [950-953].

De manière similaire aux pathogènes de la famille des TORCH, le ZIKV est également responsable d'une altération de la barrière placentaire. De plus, comme pour le HCMV, la transmission du ZIKV de la mère au fœtus et la survenue des séquelles graves en cas d'infection ne sont pas systématiques [954,955]. Enfin, des particules du ZIKV infectieuses ont été détectées dans le lait maternel et la transmission lors de l'allaitement a été prouvée [956,957].

4. Pathogenèse du ZIKV à l'interface mère-fœtus

Dès le début de 2016, de nombreuses équipes de recherche, dont la notre, se sont intéressés à étudier et à modéliser la transmission du ZIKV à l'interface mère-fœtus pour mieux comprendre la pathogenèse de l'infection.

Un des premiers freins à la modélisation de l'infection était la résistance des souris à l'infection par ZIKV. Chez l'Homme, une étude a démontré que, lors de l'infection par le ZIKV, la protéine virale NS5 peut se lier à STAT2 et induire sa dégradation par le protéasome [958]. Cette dégradation de STAT2 induit une inhibition de la signalisation par les IFN de type I, ce qui potentialise l'infection des cellules. En revanche, la protéine STAT2 murine est résistante à cette dégradation induite par NS5, ce qui pourrait expliquer la résistance des souris à l'infection [958]. Des nouveaux modèles murins susceptibles à l'infection par ZIKV ont alors été développés en utilisant des souris IFNAR^{-/-} ou en traitant les souris avec des anticorps anti-IFNAR [959,960]. En utilisant ces modèles, différentes équipes ont étudié la transmission materno-fœtale du virus et prouvé que le ZIKV infecte et endommage le placenta [961]. De plus, le virus se transmet au fœtus et cause des altérations neuro-développementales associées à une mortalité fœtale importante [962]. Plus récemment, la transmission sexuelle a été modélisée chez des souris immunocompétentes en faisant une infection intra-utérine par le ZIKV [963]. Ce modèle a également montré une transmission au fœtus associée à une neuro-inflammation et à des défauts neuro-développementaux. En plus des modèles murins, un modèle d'infection de primates non humains (macaques) par le ZIKV a été développé et caractérisé [964,965]. Ce modèle a également permis de montrer que la mort fœtale survient chez 26% des singes s'ils ont été infectés en début de grossesse, contre 0% si ils ont été infectés plus tardivement [966].

Comme décrit dans la partie I de l'introduction, il n'existe pas de modèle animal qui reproduise de manière fidèle les différentes étapes de placentation humaine. Il est donc nécessaire d'utiliser des modèles humains pour comprendre l'impact du ZIKV sur le développement placentaire. De nombreux groupes dont le notre ont ainsi utilisé des échantillons humains dont des explants *ex vivo* de décidua et de placenta, des cellules dérivées de ces tissus et des lignées de choriocarcinomes. Il a ainsi été montré que le ZIKV est capable d'infecter différents tissus dont la décidua, le placenta mais aussi le cordon ombilical [967-969]. Dans ces tissus, de nombreuses cibles cellulaires telles que les cellules stromales, les CTEV, les CTV, les dM, les cellules de Hofbauer, les cellules endothéliales mais aussi les cellules souches mésenchymateuses [113,967,968,970,971]. Ces travaux ont également permis de mieux comprendre la pathogenèse du ZIKV. Ainsi, il a été montré par le groupe de Lenore Pereira que l'infection du placenta par ZIKV bloque la capacité invasive des CTEV, ce qui pourrait expliquer en partie les défauts de placentation observés chez la

femme enceinte [972]. Nos travaux (publiés ou en cours) dans cette thématique seront détaillés dans la partie II des Résultats.

Les modèles de placentation humaine ont également permis de comparer la sévérité de l'infection par ZIKV dans des cellules du premier vs troisième trimestre de la grossesse [113]. De manière intéressante, il a été montré que les cellules du troisième trimestre sont plus résistantes à l'infection par ZIKV grâce à leur production d'IFN de type III (IFN- λ 1 et - λ 2). Le rôle protecteur de ces IFN- λ a ensuite été confirmé dans un modèle de lignée de choriocarcinome en culture 3D [973]. Enfin, l'ensemble de ces résultats a été validé dans un modèle murin en montrant que le timing de l'infection (début vs fin de grossesse) et l'IFN- λ sont tous les deux importants pour la pathogenèse placentaire du ZIKV [974,975]. Le fait que les souris IFNAR^{-/-} soient résistantes à l'infection suggère également que les IFN de type I permettent une protection efficace. Cependant il a été montré que cette protection par les IFN de type I peut également avoir des effets néfastes durant la grossesse [112]. Ainsi, en utilisant un modèle murin mais aussi humain, il a été prouvé que la réponse induite par les IFN de type I est protectrice pour la mère mais délétère pour le fœtus, notamment en causant des défauts de placentation et la mort fœtale. Ces effets néfastes ne sont cependant pas retrouvés avec les IFN de type III, qui semblent uniquement avoir un rôle protecteur [112].

5. Conséquences de l'infection sur le neuro-développement

Une des conséquences principales de l'infection par le ZIKV durant la grossesse est le développement de microcéphalie, une anomalie du neuro-développement caractérisée par une diminution du périmètre et du diamètre crânien. Depuis le début de la pandémie de 2015, plus de 2600 cas de microcéphalie ont été recensés.

Pour comprendre les mécanismes sous-jacents à cette pathologie, différentes études se sont intéressées à l'impact du ZIKV dans le cerveau en développement. Il a ainsi été montré par différents groupes que le ZIKV est capable d'infecter les cellules souches neurales [962,976,977]. Ces progéniteurs neuraux sont essentiels à la neurogenèse qui se déroule durant le développement embryonnaire. En utilisant des modèles *in vitro*, il a été montré que l'infection de ces cellules par le ZIKV induit leur apoptose, inhibe leur prolifération et dérégule leur expression génique [976-978]. Le ZIKV peut également infecter d'autres cellules du cerveau tels que les astrocytes et la microglie (macrophages résidents du cerveau) et d'inhiber leur réponse immunitaire innée [979].

En utilisant un modèle murin *in vivo*, différentes équipes ont montré que l'infection des progéniteurs neuraux par le ZIKV durant la grossesse cause les mêmes altérations que celles

observées *in vitro* (apoptose, inhibition de la prolifération, ...), ce qui conduit à un défaut de neurogenèse et au développement d'une microcéphalie [962,980,981]. Plus récemment il a été montré que, durant l'infection des cellules souches neurales, le ZIKV interagit avec la protéine Musashi-1 dans le but de favoriser sa propre réplication [982]. Ainsi, la dérégulation des fonctions de cette protéine, essentielles au neuro-développement, pourrait être directement responsable des altérations de la neurogenèse observées durant l'infection par le ZIKV. Le fait que les souris déficientes pour la protéine Musashi-1 développent une microcéphalie supporte cette possibilité [983].

Enfin, une étude récente a montré que l'infection post-natale par le ZIKV est associée à des anomalies cérébrales structurales, fonctionnelles et comportementales chez le macaque [984].

6. Récepteurs d'entrée du ZIKV

Une des particularités des Flavivirus, notamment du ZIKV et du DENV, est leur large tropisme. Concernant le ZIKV, il a notamment été montré qu'il peut infecter des cellules neurales, myéloïdes, trophoblastiques, stromales, endothéliales et épithéliales [962,967,970,979,985]. Le large tropisme de ces virus vient des récepteurs d'entrée qu'ils utilisent. Ces récepteurs sont de la famille des TIM (T-Cell Immunoglobulin and Mucin domain) et des TAM (Tyro3, AXL, Mer) et permettent l'entrée du ZIKV et du DENV de nombreuses cellules cibles [985-987]. Alternativement, le récepteur DC-SIGN peut également être utilisé pour l'entrée de ces virus [985,988].

Les récepteurs de la famille des TIM et des TAM sont spécifiques de la phosphatidylsérine exposée à la surface des corps apoptotiques. Il est maintenant connu que de nombreuses familles de virus dont les Flavivirus abusent de cette reconnaissance pour infecter leurs cibles cellulaires. Durant ce processus, nommé mimétisme apoptotique, les virus exposent de la phosphatidylsérine à la surface de leur enveloppe lipidique et interagissent directement ou indirectement avec les récepteurs TIM et TAM pour s'attacher aux cellules cibles et ainsi initier leur cycle infectieux [989].

Dans le cas du ZIKV, il a été montré que les récepteurs TIM-1, Tyro3, AXL et DC-SIGN participent à l'entrée du virus [985]. Cependant, les récepteurs utilisés diffèrent en fonction du type cellulaire considéré. Il a ainsi été montré que le récepteur AXL est nécessaire à l'entrées du ZIKV dans les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les fibroblastes mais aussi dans les astrocytes et la microglie [970,979,985]. Au contraire, l'infection des progéniteurs neuraux est indépendante de l'expression d'AXL [990]. Concernant les récepteurs d'entrée du ZIKV durant la grossesse, les données de la littérature sont moins

claires. Il a cependant été montré que TIM-1 est exprimé dans l'ensemble des tissus et des cellules à l'interface mère-fœtus [968]. Les récepteurs AXL et Tyro3 sont également exprimés mais uniquement dans certains tissus et pas chez tous les donneurs. En revanche, il a clairement été démontré que TIM-1 et AXL sont essentiels pour l'infection des cellules épithéliales amniotiques [968].

Enfin, l'utilisation des différents récepteurs semble aussi dépendante de l'espèce. En effet, à la différence des études précédemment décrites et réalisées chez l'Homme, il a été montré chez la souris que l'infection (placentaire, vaginale ou cérébrale) par ZIKV se fait indépendamment des récepteurs TAM [991].

7. ZIKV et réponse immune

De nombreuses études se sont intéressées à la relation entre le ZIKV et le système immunitaire. Le virus est capable d'interagir avec diverses cellules de l'immunité ou adaptative. Cette relation peut être bénéfique ou délétère pour le ZIKV, en fonction du type cellulaire considéré. En plus de son interaction avec le système immunitaire, il semblerait également que le ZIKV interagisse préférentiellement avec des cellules tumorales. Il a ainsi été démontré une activité anti-tumorale du ZIKV dans des modèles de tumeurs cérébrales [992,993].

a. Réponse immune innée

Parmi les cellules de l'immunité innée qui interagissent avec le ZIKV, on trouve notamment les DC, les monocytes/macrophages et les cellules NK. Il n'existe que peu d'études qui documentent l'infection des DC. Il a cependant été montré que le ZIKV est capable d'infecter les DC *in vitro* et *in vivo* chez l'Homme [994,995]. De plus, les DC infectées par le ZIKV présentent un défaut d'activation, de maturation et de réponse IFN de type I, qui permet d'augmenter la susceptibilité des cellules au virus et limite la mise en place de la réponse adaptative.

Les monocytes/macrophages jouent un rôle central lors de l'infection par le ZIKV et dans sa dissémination. Les macrophages tissulaires ont été décrits comme étant des cellules cibles du ZIKV dans de nombreux tissus tels que l'utérus gestant (dM), le placenta (cellules de Hofbauer) et le cerveau (microglie) [967,971,979]. L'infection par ZIKV a également été décrite dans un modèle de macrophages différenciés *in vitro* à partir de cellules souches pluripotentes [996]. Concernant le compartiment sanguin, il a été montré *in vitro* et *in vivo* que la souche Asiatique du ZIKV est capable d'infecter préférentiellement les monocytes non-classiques (CD14⁺CD16⁺⁺) et d'induire une polarisation de ces cellules vers un profil M2 immunosuppresseur associé à une forte production d'IL-10 [997,998]. Cette dérive

phénotypique et cette immunosuppression sont encore plus importantes chez la femme enceinte. Cette population de monocytes pouvant patrouiller dans l'organisme, leur infection par la souche Asiatique du ZIKV pourrait favoriser la dissémination du virus dans l'organisme. La souche Africaine du ZIKV est également capable de cibler cette population mais elle induit une réponse de type M1 pro-inflammatoire [997].

Dans une étude sur le Virus de la forêt de Semliki, les auteurs ont montré que la piqûre de moustique induit une inflammation locale dans un modèle murin [999]. Cette inflammation va alors permettre l'activation des macrophages résidents et le recrutement de neutrophiles. Ces neutrophiles vont ensuite sécréter du CCL2 qui va permettre le recrutement local de monocytes CCR2⁺. Ces cellules sont alors infectées par le virus et retournent dans la circulation, facilitant ainsi la dissémination virale. Même s'il n'a pas encore été étudié, il est possible qu'un tel mécanisme se ait également lieu lors de la transmission vectorielle du ZIKV. Le fait que le virus infecte les monocytes circulants renforce cette possibilité.

Enfin, concernant les cellules NK, il a été montré que les cellules infectées par le ZIKV augmentent leur expression du CMH-I [1000]. Cette expression accrue de CMH-I permet aux cellules infectées d'échapper à la lyse induite par les cellules pNK et pourrait constituer un mécanisme d'échappement viral. En revanche, rien n'est connu sur le rôle des cellules dNK lors de l'infection par le ZIKV à l'interface materno-fœtale. Durant ma thèse, nous nous sommes intéressés à cette thématique (Partie II des Résultats).

b. Réponse immunitaire adaptative

L'étude des réponses par les LT a majoritairement été faite dans des modèles murins immunocompétents qui sont donc résistants à l'infection. L'étude de la réponse immunitaire chez ces souris a permis de découvrir que les LT CD4 et les LT CD8 sont impliqués dans le contrôle de l'infection [1001]. Lors de l'infection, les LT CD4 se différencient en cellules TH1 et les LT CD8 se différencient en cellules effectrices, toutes deux productrices d'INF- γ , qui permettent un contrôle efficace du ZIKV. Cette étude a également permis l'identification d'un nouvel épitope des LT CD8, dérivé de l'enveloppe virale, qui est reconnu par la majorité des cellules répondeuses.

En continuant de caractériser la réponse LT, deux études ont démontré une protection croisée entre le ZIKV et le DENV médiée par les LT CD8 [1002,1003]. Ainsi, la présence de LT CD8 spécifiques du DENV améliore la résistance des souris IFNAR^{-/-} à l'infection par ZIKV et protège le fœtus durant la grossesse [1002]. Enfin, même si les LT CD8 permettent un contrôle efficace de l'infection, ils peuvent également participer à la pathogenèse virale [1004]. Ainsi, l'infection du cerveau par ZIKV cause un recrutement massif de cellules immunes, majoritairement des LT CD8, qui participent au contrôle de l'infection mais qui

induisent une paralysie des membres postérieurs. La déplétion spécifique des LT CD8 inhibe cette paralysie mais cause une exacerbation de l'infection par le ZIKV.

En plus de la réponse par les LT, la réponse anticorps joue un rôle important dans le contrôle de l'infection par le ZIKV. Il a été montré que l'injection d'anticorps neutralisants humains permet d'inhiber la réplication du ZIKV, réduit la mortalité et prévient le développement de pathologies placentaires [1005]. En parallèle, une autre étude a utilisé le sérum d'un patient convalescent récemment infecté par ZIKV pour conférer une protection contre l'infection cérébrale et le développement de la microcéphalie [1006]. Ces deux études ont permis de montrer l'importance des anticorps dans la protection contre l'infection par le ZIKV et le développement des pathologies associées. Quelques mois après, des vaccins composés de l'ARN messager des protéines E et PrM encapsidé dans une nanoparticule lipidique ont été développés [1007,1008]. L'utilisation de ce vaccin permet une protection efficace contre les maladies congénitales induites par le ZIKV [1009]. Plus récemment, il a également été montré chez la souris qu'une première infection asymptomatique par le ZIKV permet la mise en place d'une protection prophylactique efficace en cas de réinfection qui perdure lors de la grossesse [1010].

Objectifs

Durant la grossesse, le fœtus est séparé de la mère par le placenta qui constitue une barrière protectrice efficace. Cependant, cette barrière n'est pas totalement imperméable et permet de nombreux échanges (nutriments, hormones, déchets, ...) dans des zones bien spécifiques nommées interfaces materno-fœtales. Au niveau de ces zones, les cellules fœtales entrent en contact direct avec le sang et les tissus maternels. Cependant, certains pathogènes qui infectent la mère peuvent rejoindre ces interfaces, franchir la barrière placentaire et se disséminer au fœtus. Parmi ces virus, on trouve notamment le virus de l'Hépatite E (VHE), qui représente un véritable problème de santé publique dans les pays en développement et tout particulièrement en Inde. Le premier objectif de ma thèse a été de mettre au point un modèle d'infection de l'interface mère-fœtus par le VHE et d'étudier les conséquences de l'infection. Ce modèle nous a permis de comparer les différents géotypes viraux et de découvrir que la sévérité de l'infection par le VHE à l'interface mère-fœtus est conditionnée par le géotype viral.

En parallèle de ces travaux, nous avons été témoins de la pandémie causée par le virus Zika (ZIKV) en Amérique du Sud et tout particulièrement au Brésil. Cette émergence du ZIKV a rapidement été associée à de nombreux cas de transmission verticale, associée à des malformations chez le nouveau-né et des pathologies placentaires. A partir de mars 2016, nous avons eu accès à la souche virale endémique en Amérique latine. Le deuxième objectif de ma thèse a alors été d'étudier la pathogenèse du ZIKV durant la grossesse. Ainsi, nos travaux furent parmi les premiers à définir le large tropisme du ZIKV à l'interface mère-fœtus durant le premier trimestre de grossesse. Nous avons ensuite poursuivi ces travaux et caractérisé les conséquences de l'infection sur la fonction sécrétrice du placenta. Enfin, nous avons découvert que les cellules dNK, présentes en grand nombre dans la *decidua basalis*, participent au contrôle de l'infection par le ZIKV. Ce contrôle pourrait permettre de limiter la transmission verticale du virus et de protéger le fœtus.

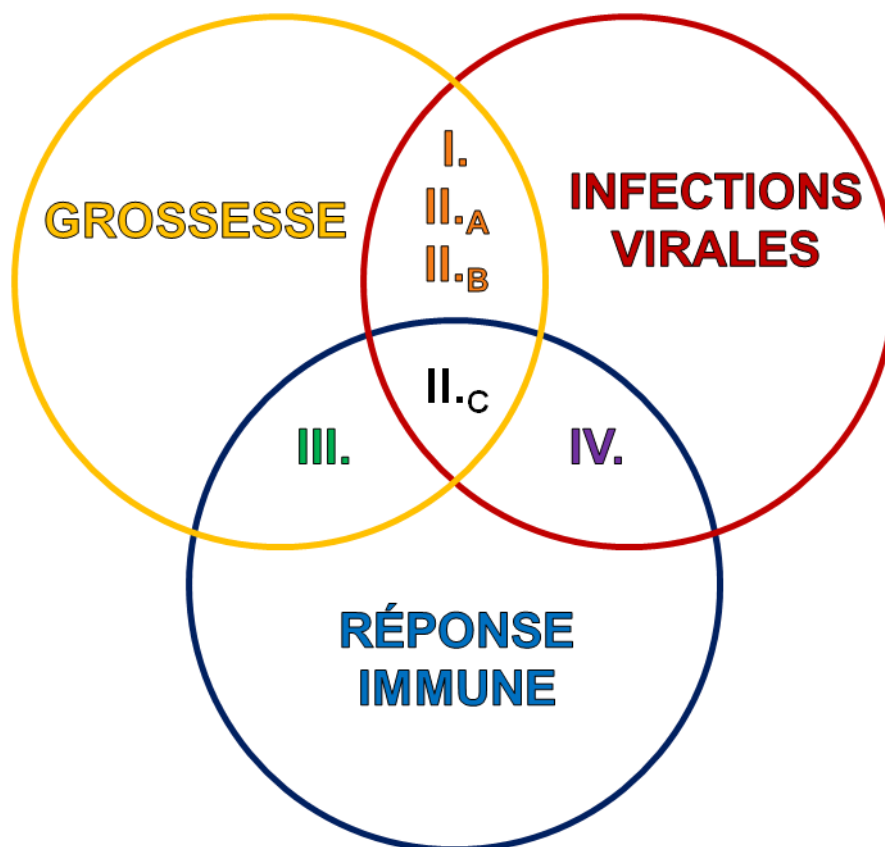
Durant ma thèse, notre équipe s'est également intéressée au rôle du microenvironnement cytokinique dans le contrôle de la fonction des cellules NK. En utilisant comme modèle les variants d'épissage des récepteurs NKp30 et NKp44, mon équipe a montré que les cellules dNK expriment un répertoire unique d'isoformes, bien distinct de celui des cellules pNK. De plus, ces différences phénotypiques entre les cellules pNK et dNK sont également associées à des différences fonctionnelles. Durant ma thèse, j'ai eu l'opportunité de travailler sur ce projet initié et développé par ma directrice de thèse et le doctorant qui m'a précédé. Ainsi, mon troisième objectif de thèse a été d'étudier l'impact du microenvironnement cytokinique de la décidua sur la régulation des fonctions effectrices des cellules NK.

Enfin, dans une dernière partie, j'ai eu le privilège de travailler avec un chercheur postdoctoral de mon équipe sur la pathogenèse du VHE. Dans les pays développés,

l'infection par le VHE est majoritairement asymptomatique chez des patients jeunes mais est fréquemment associée à des formes cliniques chez les personnes âgées. Ainsi, le quatrième et dernier objectif de mes travaux de thèse a été d'étudier les mécanismes qui sous-tendent la pathogenèse exacerbée du VHE chez les personnes âgées. Nous nous sommes tout particulièrement intéressés au rôle de la réponse immune (LT CD8, LT CD4, NK).

En conclusion, mes travaux de thèse se situent à l'interface entre la grossesse, les infections virales et la réponse immune. Ils seront divisés en quatre parties intitulées:

- I. La pathogenèse du virus de l'Hépatite E (VHE) à l'interface mère-fœtus est conditionnée par le génotype viral
- II. Infection par le virus Zika (ZIKV) durant le premier trimestre de grossesse : pathogenèse et réponse immune
 - A. Tropisme du ZIKV à l'interface mère-fœtus
 - B. Impact de l'infection par le ZIKV sur le sécrétome placentaire
 - C. Contrôle de l'infection déciduale du ZIKV par les cellules dNK
- III. Le microenvironnement cytokinique décidual lors de la grossesse régule la fonction des cellules NK *via* l'épissage alternatif des récepteurs NKp30 et NKp44
- IV. Un biais fonctionnel des lymphocytes T CD8 effecteurs mémoire sous-tend la pathogenèse exacerbée du virus de l'hépatite E chez les personnes âgées



Résultats

I. La pathogenèse du virus de l'Hépatite E (VHE) à l'interface mère-fœtus est conditionnée par le génotype viral

Dans la première partie de mes travaux de thèse, nous avons étudié la pathogenèse du VHE durant la grossesse. De nombreuses études avaient documenté l'association entre l'infection par le VHE-1 et la survenue d'hépatites fulminantes chez la femme enceinte [745,845,848-850]. De plus, cette sévérité semblait spécifique du VHE-1, puisque les rares cas d'infection par le VHE-3 durant la grossesse sont sans conséquences sur la mère et le fœtus [870-872]. De manière surprenante, malgré les nombreuses études réalisées, aucune donnée n'existait concernant un éventuel tropisme extra-hépatique du VHE durant la grossesse. En 2014, une étude réalisée sur des placentas infectés *in utero* a révélé la présence du brin négatif de l'ARN du VHE, suggérant ainsi une réplication active du virus dans ce tissu [863]. Cette observation a servi de base à notre projet.

Notre hypothèse était que, durant la grossesse, le VHE est capable d'infecter les tissus de l'interface materno-fœtale et de s'y répliquer avant de se transmettre au fœtus. Cependant, comme il est le seul associé à des complications cliniques, le VHE-1 devrait avoir un meilleur tropisme et/ou des conséquences plus graves que le VHE-3 durant la grossesse. Pour tester cette hypothèse, nous avons développé le premier modèle d'infection *ex vivo* d'explants tissulaires de décida et de placenta du premier trimestre de grossesse par le VHE. En parallèle, avons isolé les cellules du stroma décidual et placentaire afin d'identifier les cibles cellulaires du virus.

En utilisant ce modèle d'infection, nous avons comparé différents génotypes viraux et avons découvert que le VHE-1 et le VHE-3 sont capables d'infecter la décida et le placenta. Cependant, l'infection par le VHE-1 est plus importante et est associée à des conséquences plus graves. L'analyse histologique des tissus infectés nous a permis de montrer que le VHE-1 induit de nombreux dommages qui altèrent l'architecture tissulaire. L'infection par le VHE-1 est également associée à une dérégulation de la sécrétion de facteurs solubles qui sont impliqués dans l'induction des dommages tissulaires. De plus, nous avons analysé la production d'IFN et avons montré que l'infection par le VHE-1 inhibe partiellement la sécrétion d'IFN- λ 2/3 dans les tissus. L'IFN- λ 2 limitant la réplication du VHE-1 dans les explants de décida et de placenta, son inhibition par le virus pourrait expliquer le meilleur tropisme du VHE-1 à l'interface mère-fœtus. Enfin, en utilisant les cellules stromales isolées de la décida et du placenta, nous avons confirmé le meilleur tropisme du VHE-1 à l'interface mère-fœtus, par comparaison avec le VHE-3. De plus, ces cellules ont également

une sécrétion cytokinique altérée lors de l'infection par le VHE (surtout VHE-1) et sont infectables par les virions produits dans les tissus.

En conclusion, ces travaux nous ont permis de prouver que la pathogenèse du VHE-1 à l'interface materno-fœtale est plus sévère que celle du VHE-3. Cette différence pourrait être un des éléments qui explique la différence de sévérité des différents génotypes du VHE durant la grossesse. L'ensemble de ces travaux, dont je suis premier auteur, a été accepté pour publication dans le journal *Nature Communications*.

Genotype Specific Pathogenicity of Hepatitis E Virus at the Human Maternal-Fetal Interface

Jordi Gouilly¹, Qian Chen¹, Johan Siewiera², Géraldine Cartron³, Claude Levy⁴, Martine Dubois⁵, Reem Al-Daccak⁶, Jacques Izopet^{1,5}, Nabila Jabrane-Ferrat^{1,*}, and Hicham El Costa^{1,5,*}

¹Centre of Pathophysiology Toulouse Purpan, INSERM U1043, CNRS UMR5282, Toulouse III University, 31024 Toulouse, France.

²University of California San Francisco, School of Medicine, Laboratory of Medicine, San Francisco, California, USA.

³Service de Gynécologie-Obstétrique, Hôpital Paule de Viguier, Centre Hospitalier Universitaire, 31059 Toulouse, France.

⁴Service de Gynécologie-Obstétrique, Clinique Sarrus-Teinturiers, 31300 Toulouse, France.

⁵Laboratoire de Virologie, Institute of Federative Biology, Centre Hospitalier Universitaire, 31059 Toulouse, France.

⁶INSERM UMRS976, Université Paris Diderot, Hôpital Saint-Louis, 75010 Paris, France.

*These authors contributed equally and share senior authorship.

Short Title: Hepatitis E Virus Infection During Pregnancy

List of abbreviations: HEV, Hepatitis E virus; IL-, interleukin; CCL-, CXCL-, chemokine; RT-qPCR, real time quantitative polymerase chain reaction; H&E, hematoxylin and eosin; sICAM-1, soluble intercellular adhesion molecule; G-CSF, granulocyte colony stimulating factor; GM-CSF, granulocyte macrophage colony stimulating factor; VEGF-, vascular endothelial growth factor; MMP-, matrix metalloproteinase; CM, conditioned medium; ORF, open reading frame.

Keywords: Hepatitis E, viral genotype, pregnancy, pathogenesis, cytokines/chemokines.

Corresponding authors: Nabila Jabrane-Ferrat, PhD, e-mail: nabila.jabrane-ferrat@inserm.fr or Hicham El Costa, PhD, e-mail: hicham.el-costa@inserm.fr ; Centre de Physiopathologie Toulouse Purpan ; INSERM U1043, CNRS UMR5282, Université Toulouse III, 31024 Toulouse, France; fax: (33) 562-74-45-58.

Abstract

Hepatitis E virus (HEV) infection, particularly HEV genotype 1 (HEV-1), can result in fulminant hepatic failure and severe placental diseases, but mechanisms underlying genotype-specific pathogenicity are unclear and appropriate models are lacking. Here, we model HEV-1 infection *ex vivo* at the maternal-fetal interface using the decidua basalis and fetal placenta, and compare its effects to the less-pathogenic genotype 3 (HEV-3). We demonstrate that HEV-1 replicates more efficiently than HEV-3 both in tissue explants and stromal cells, produces more infectious progeny virions and causes severe tissue alterations. HEV-1 infection dysregulates the secretion of several soluble factors. These alterations to the cytokine microenvironment, correlate with viral load and contribute to the tissue damage. Collectively, this study characterizes an *ex vivo* model for HEV infection and provides insights into HEV-1 pathogenesis during pregnancy that are linked to high viral replication, alteration of the local secretome and induction of tissue injuries.

Introduction

Hepatitis E Virus (HEV) is a single-stranded, positive polarity RNA virus that belongs to the *Hepeviridae* family. Human cases of hepatitis E are caused by *Orthohepevirus A* species which comprises eight genotypes¹. Genotypes 1 and 2 are obligate human pathogens transmitted by the fecal-oral route that have been associated with large outbreaks and epidemics in developing countries. Genotypes 3, 4, and 7 are responsible for sporadic cases of zoonotic hepatitis E, primarily in industrialized countries^{2,3}.

HEV infection is usually asymptomatic or causes acute self-limiting illness. In countries with poor sanitation, HEV-1 infection during pregnancy often results in fulminant hepatic failure (FHF, in 15 to 30% of cases) associated with severe placental diseases, including eclampsia, hemorrhage, membrane rupture, spontaneous abortion, and stillbirths^{2,4}. These fatal outcomes resemble those reported for other harmful pathogens during pregnancy and can be attributed to dysfunctions at the maternal-fetal interface composed of the pregnant endometrium lining or *decidua basalis* (decidua), and fetal placenta⁵⁻⁷. In western countries where genotype 3 (HEV-3) prevails, HEV infection is rather harmless during pregnancy⁸⁻¹⁰.

Significant effort has been made towards understanding HEV-1-induced FHF during pregnancy. However, the causal relationship between infection and placental dysfunction remains elusive. The lack of appropriate *in vivo* and *in vitro* experimental models and the difficulty to propagate the virus *in vitro* hampered the understanding of this genotype-specific pathogenesis in pregnant women. Although case reports and longitudinal studies using peripheral blood samples have incriminated viral load, immune response, hormones, and few signaling pathways in the observed adverse pregnancy outcomes^{4,11}, peripheral responses do not accurately reflect the events occurring at the maternal-fetal interface¹². To our knowledge, only a single study identified viral components in placental tissue from HEV-1-infected women, suggesting the placenta as an extra-hepatic site for viral replication¹³.

To provide insights into the genotype-specific pathogenicity of HEV during pregnancy, we *ex vivo* modeled the pathological HEV-1 and less-pathological HEV-3 infection at the maternal-fetal interface using organ culture from the maternal decidua and fetal placenta. While both HEV genotypes are able to infect the maternal-fetal interface, HEV-1 replicates more efficiently in decidua and placenta tissue explants as well as in primary fibroblast-like stromal cells isolated from both tissues, produces higher amounts of infectious progeny virions and causes severe morphological alterations. Furthermore, viral replication correlates with pronounced alterations in the cytokine, chemokine and growth factor networks at the maternal-fetal interface resulting in an exacerbated tissue injury.

Collectively, the genotype-specific fatal outcomes during pregnancy are likely linked to efficient viral replication and a dysregulated local secretome.

Results

Maternal-fetal interface supports high HEV-1 replication

We *ex vivo* modeled HEV infections at the maternal-fetal interface using organ cultures of the maternal decidua and fetal placenta from elective pregnancy terminations and examined their susceptibility to clinical strains of HEV-1 and HEV-3 isolated at the acute phase of infection from the feces of a traveler returning from India and an autochthone infected patient respectively. Quantitative RT-PCR analysis revealed a substantial replication of HEV-1 that reached a plateau within two days in the placenta and five days in the decidua (Fig. 1a,b). Although following similar trend, HEV-3 replication was significantly lower in both tissues.

HEV replication is highly sensitive to anti-viral drugs such as ribavirin (RBV) both *in vitro* and in clinical settings^{2,14}. To further corroborate our observation that HEV replicates at the maternal-fetal interface, we treated infected tissues with an optimal dose of 50μM of RBV and monitored viral replication over time. Treatment with RBV resulted in strong inhibition of HEV-1 and HEV-3 replication both in the decidual and placental tissue explants (Supplementary Fig. 1). The lack of viral replication in tissue explants exposed to UV-irradiated virions further strengthens the active replication of HEV at the maternal-fetal interface. The fact that RBV treatment did not completely abrogate the viral replication in the placenta organ cultures is probably due to the complexity of the tissue architecture. Nonetheless, our findings demonstrate that the detection of viral genome in the culture supernatants is reminiscent of active viral replication.

To ascertain the tropism of HEV-1 during pregnancy, we then performed *in situ* hybridization (ISH) on the infected tissue explants using a set of probes covering the whole HEV genome (Fig. 1c,d). Hybridization with HEV probes resulted in a higher amount of dot-like signals in HEV-1 infected samples compared to HEV-3. In addition, HEV-1 positive cells showed a spatial clustered signal distribution indicative of replication foci (Fig. 1c). Compared to HEV-3, HEV-1-related signal tends to be more intense (Fig.1c). Nonetheless, quantitative analysis using large microscopy fields revealed a 2 to 3-fold higher number of cells infected with HEV-1 than HEV-3 in both tissues (Fig. 1d).

Taken together, these experiments demonstrate that the maternal-fetal interface supports HEV replication with a better tropism for HEV-1.

HEV-1 infection is associated with tissue injury

Lessons from the TORCH (Toxoplasma, Others, Rubella virus, Cytomegalovirus, and Herpes simplex virus) infections have revealed that viral replication at the maternal fetal interface is associated with tissue damage and adverse pregnancy outcome^{15,16}. Furthermore, apoptotic and necrotic features were previously reported in liver biopsies from HEV infected patients^{17,18}. Accordingly, we assessed whether HEV infection impairs the morphology of the maternal-fetal interface. We first evaluated the programmed cell death by Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling (TUNEL) staining of tissue sections five days post infection (Fig. 2a,b). Mock infected tissues showed a sparse to no TUNEL staining whereas a significant increase in the proportion of TUNEL positive cells in HEV-1 infected decidua and placenta tissue explants was observed (Fig. 2a,b). Apoptotic cells were depicted both in the outer syncytiotrophoblast and the inner cytotrophoblast layers as well as in the villus core of the placenta. In contrast to HEV-1, HEV-3 infection led to scattered apoptotic cells in both the decidua and placenta (Fig. 2a,b).

We next analyzed whether HEV infection impairs the architecture of the maternal-fetal interface. Hematoxylin-Eosin (HE) staining demonstrates that HEV-1 infection induces significant injury to the decidua and placenta as evidenced by the necrotic features such as pyknosis, karyorrhexis, and karyolysis (Fig. 2c,d). Furthermore, HEV-1-infected placenta displayed a drastic disruption of the trophoblastic layer (Fig. 2d). The effects of HEV-3 infection were milder in both tissues (Fig. 2c,d).

Taken together, our findings demonstrate that HEV-1 infection induces significant increase in tissue injury at the maternal-fetal interface that might account for the morbid pregnancy complications reported during pregnancy.

HEV-1 skews the tissue secretome and promotes tissue damage

The soluble microenvironment within the uterine mucosa, within first semester of pregnancy, is mandatory not only for embryo implantation but also for the maternal-fetal tolerance. Any alteration to the local secretome can provoke pregnancy-related disorders^{19,20}. Therefore, we assessed the impact of HEV-1 and HEV-3 infection on the maternal-fetal interface secretory profile. Based on their respective roles during pregnancy¹⁹⁻²², the levels of selected cytokines (IL-6, IL-15, IL-18, TNF- α and sICAM-1), chemokines (CCL-3, CCL-4, CCL-5, and CXCL-10), growth factors (G-CSF, GM-CSF, and VEGF-A), and metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) were quantified in tissue culture supernatants two days post infection (Fig. 3).

We observed three secretion profiles upon infection of decidual and placental tissues with HEV. The first profile includes factors that are not affected by infection such as G-CSF, VEGF-A, MMP-2, and MMP-9 in the decidua (Fig. 3a) and VEGF-A, MMP-2 in the placenta (Fig. 3b). The second profile comprises factors that are increased by infection independently of the viral genotype including sICAM-1 and GM-CSF in both tissues (Fig. 3a,b), or G-CSF and MMP-9 only in the placenta (Fig. 3b). The last profile consists of pro-inflammatory factors (IL-6, CCL-3, CCL-4 and CXCL-10) that are differentially regulated by HEV-1 and HEV-3 infection. Compared to HEV-3, IL-6, CCL-3, and CCL-4 secretion is markedly enhanced by HEV-1 infection, whilst CXCL-10 is significantly depressed in both tissues. Regardless of the infection, TNF- α , IL-15, IL-18 and CCL-5 were absent or barely detected.

We next investigated the relationship between the level of the differentially altered factors and HEV-1 or HEV-3 replication in decidual and placental tissue. The secretion levels of IL-6, CCL-3, CCL-4, CXCL-10, and HEV-1 load in decidual explants were highly correlated with a $0.0001 \leq P \text{ value} \leq 0.003$ and a $R \text{ value} \geq 0.80$ using Spearman's ranked correlation test (Fig. 3c). HEV-1 load was also highly correlated with CCL-3, CCL-4, CXCL-10 levels in the placenta with a $0.047 \leq P \text{ value} \leq 0.0001$ and a $R \text{ value} \geq 0.82$ using Spearman's ranked correlation test (Fig. 3d). Although it reached significance, the effect of HEV-1 replication on the IL-6 placental production was very low. Unlike HEV-1, only moderate correlations were observed between HEV-3 and cytokine production both in the decidua and placenta samples (Supplementary Fig. 2).

To further visualize the global pattern of soluble factor secretion during HEV-1 and HEV-3 infection, we included IL-6, CCL-3, CCL-4 and CXCL-10 decidual and placental levels in a principal component analysis (Fig. 3e). HEV-1 and HEV-3 infected samples naturally clustered into two distinct groups with HEV-1 at the far end of the mock, whilst HEV-3 clustered at an intermediate position. Thus, PCA analysis reveals a genotype-specific cytokine signature that discriminates HEV-1 from HEV-3 and may contribute to the differential viral pathogenicity at the maternal-fetal interface.

To determine the impact of the changes in the cytokine environment, we challenged fresh decidua and placenta organ cultures with UV-irradiated conditioned medium (UV-CM) harvested from their respective HEV-1- or HEV-3-infected explant cultures. The TUNEL assay (Fig. 4a,b) and HE staining of histological sections (Fig. 4c,d) revealed that the tissue injury is significantly more prominent with UV-CM obtained from HEV-1-infected samples for both the decidua and placenta. Nonetheless, the tissue disruption in the presence of UV-

CM is less prominent than with the original inoculum (Fig. 2) suggesting that HEV-induced damage was at least partially due to alterations in the cytokine/chemokine networks.

Taken together, our data demonstrate that HEV-1 infection has higher capacity than HEV-3 to alter the secretome at the maternal-fetal interface further contributing to HEV-1 associated tissue injury.

HEV-1 replication impairs the type III interferon secretion

Innate sensing of invading pathogens has been clearly associated with the production of interferons (IFNs) that can impede the replication of a broad spectrum of viruses²³⁻²⁷. Nonetheless, at mid-gestation, the human placenta produces large amounts of type III IFNs even in the absence of threats. This constitutive release of IFNs correlated with expression of interferon-stimulated genes (ISGs) have been suggested as a persistent defense mechanism during the second trimester of pregnancy²⁸. In order to shed light on the mechanisms that underlie the discrepancies between HEV-1 and HEV-3 replication at the maternal-fetal interface, we assessed the secretion profiles of type I (IFN- α 2 and - β), type II (IFN- γ) and type III (IFN- λ 1, - λ 2/3) IFNs in tissue culture supernatants two days post infection (Fig. 5). Regardless of the infection, both the decidua and the placenta produced low levels of IFN- α 2, IFN- β and IFN- γ (Fig. 5a,b). However, HEV-1 infection significantly impaired the production of IFN- λ 1 and IFN- λ 2/3 in the decidual, and IFN- λ 2/3 in the placental explants, whilst HEV-3 infection has no impact on type III IFN secretion (Fig. 5a,b). Correlation analyses demonstrated that the production of IFN- λ 1 and IFN- λ 2/3 is negatively correlated with HEV-1 load in the decidua ($p \leq 0.0087$ by Spearman's ranked correlation test, Fig. 5c), while correlation is observed only for IFN- λ 2/3 in the placental tissues ($p = 0.0096$ by Spearman's ranked correlation test, Fig. 5d).

To ascertain the role of type III IFNs in HEV infection, we treated infected tissues with either IFN- λ 1 or IFN- λ 2 and monitored viral replication over time. Quantitative RT-PCR analysis revealed that both cytokines significantly inhibit HEV-1 replication in the decidual tissue explants (Fig. 5e). However, the effect of these cytokines was less prominent in the placental settings and inhibition was observed only with IFN- λ 2 treatment (Fig. 5f).

Taken together, these findings suggest that HEV-1 antagonizes type III IFN production to sustain its efficient replication at the maternal-fetal interface.

HEV-1 targets stromal cells at the maternal-fetal interface

Stromal cells contribute actively to the maintenance of tissue homeostasis by supporting the tissue vascular remodeling and the development of the fetal placenta, which are mandatory for a successful pregnancy²⁹. Several pathogens that threaten the pregnancy replicate within these cells impacting their proper function^{22,29-31}. Therefore, we next assessed whether fibroblast-like stromal cells (stroma) derived from decidual and placental tissues could support HEV replication (Fig. 6). We infected freshly isolated decidual and placental stromal cells with either HEV-1 or HEV-3 and monitored viral replication over time. In parallel, we used the prototypic human hepatocellular carcinoma HepG2/C3A cell line as a control (Supplementary Fig. 3). Quantitative RT-PCR analysis demonstrated that the replication of HEV-1 was significantly higher than HEV-3 after seven days of infection, reaching 4.6-fold and 2.4-fold increase in decidual and placental stromal cells respectively (Fig. 6a,b). The presence of the ORF2 viral capsid protein in both stromal cell types further confirmed the higher infection of HEV-1 (Fig. 6c,d). In contrast to stromal cells, the HepG2/C3A cell line showed efficient replication only for HEV-3 as demonstrated by quantitative RT-PCR analysis and ORF2 immunostaining (Supplementary Fig. 3). In agreement with previous data³², microscopic analysis did not show any cytopathic effects of HEV-1 or HEV-3 in these primary stroma cells.

Collectively, our data identify the maternal-fetal stromal cells as targets for HEV infection that are more likely to support HEV-1 replication rather than HEV-3.

HEV-1 alters the secretome of primary stromal cells

We next investigated whether HEV infection impairs the dynamic secretory function of stroma cells^{19,20,22,29}. Two days post-infection, supernatants were collected from HEV-1, HEV-3, or mock-infected decidual and placental stromal cell cultures, and soluble factors were subsequently quantified (Fig. 7). Compared to HEV-3, HEV-1 infection resulted in significant increase of several pro-inflammatory mediators including IL-6, sICAM-1, CCL-3, CCL-4, G-CSF, and GM-CSF in decidual cells (Fig. 7a). Infection of placental cells induced lesser amounts of these mediators with significantly higher secretion of IL-6 and sICAM-1 in HEV-1 infected cultures (Fig. 7b). Irrespective of HEV genotype, VEGF-A was increased only in placental stroma and the production of metalloproteinases was not affected in both cell types (Fig. 7a,b).

Taken together, these results demonstrate that HEV-1, and to a lesser extent HEV-3, skews the cytokine, chemokine, and growth factor secretory profile in both the decidual and placental stroma, corroborating the observations made with tissue explants. Thus, the HEV-1

infection of decidual and placental stroma cells may not only favor viral dissemination but also impair their tissue-support functions and underlie some of the adverse pregnancy outcomes associated with this HEV genotype.

HEV-1 and HEV-3 progeny display differential infectivity

To provide further insights into the differential pathogenicity of HEV-1 and HEV-3 at the maternal-fetal interface, we assessed the infectivity of HEV-1 and HEV-3 progeny virions. Equivalent copy number of viral RNA recovered from HEV-1 and HEV-3 infected decidual and placental explant supernatants were used to infect primary stromal cells or HepG2/C3A cell line. Data depicted in figure 8 demonstrate that supernatants recovered from infected tissues contain infectious progeny virions that can replicate in both type of cells. Compared to HEV-3, HEV-1 virions replicated at a significantly higher rate in decidual and placental stroma cells (Fig. 8a,b). In contrast, HEV-3 virions replicated more efficiently in HepG2/C3A cells (Fig. 8c,d). Thus, HEV-1 infection of the maternal-fetal tissues generates infectious progeny virions that preserve the tropism of the original inoculum and replicate more efficiently than HEV-3 in both decidual and placental stroma cells. The HEV-1 progeny virions released at the maternal-fetal interface could then easily spread to neighboring cells, thereby promoting viral dissemination *in utero* and might explain the underlying pathogenicity of HEV-1 rather than HEV-3 during pregnancy.

Discussion

The mechanisms underlying HEV genotype-specific severity during pregnancy and viral transmission to the fetus remain poorly understood. Using an *ex vivo* model of first trimester maternal-fetal interface, we provide here the first evidence that the decidua and the placenta are prone to HEV-1 infection rather than HEV-3, resulting in the generation of infectious progeny virions.

Being highly irrigated, the maternal-fetal interface is exposed to viral particles present in circulating blood after ingestion of infected components or release of progeny virions from infected hepatocytes^{33,34}. The presence of high viral loads in sera from pregnant women with FHF and experiencing placental disease is in favor of this hematogenous spread³⁵. Our findings advance the state-of-the-art by highlighting the interplay between the decidua and the placenta at the maternal-fetal interface in association with the preponderance of stroma cells as a vertical transmission mechanism of HEV similar to the TORCH pathogens^{5,6,19,30,36}.

Genotype-dependent factors may favor HEV-1 replication in decidual and placental tissues. The newly discovered ORF4 protein encoded by the HEV-1 genome could therefore recruit other viral proteins and/or host-related factors to promote HEV-1 replication³⁷. The expression of the ORF1 and ORF3 viral proteins can also impair the host innate immune response through blockade of the IFN or retinoic-acid-inducible gene-1(RIG-1)-like signaling pathways resulting in viral escape^{38,39}. Several reports have highlighted differences in the production of IFNs as well as the subsequent induction of ISGs^{23-27,40}. Both the HEV strain and experimental settings could probably contribute to these discrepancies. Herein, neither HEV-1 nor HEV-3 induced type I and type II IFN secretion at the maternal-fetal interface. However, HEV-1 viral load was negatively correlated to the expression of type III IFNs and CXCL10. This significant decrease of IFN- λ , associated with the inhibition of HEV-1 replication by type III IFNs, suggest that HEV-1 subverts the IFN signaling pathway to replicate efficiently. The moderate inhibition of HEV-1 by IFN- λ 2 in placental tissue might be inherent to the tissue architecture and factors, the induction of IFN resistant ISGs or persistent activation of the JAK/STAT signaling²⁵.

Our findings highlight also a distinct pathogenicity between HEV genotypes at the maternal-fetal interface and provides a plausible explanation for the discrepant outcomes between HEV-1 and HEV-3 infection during pregnancy. We clearly demonstrate that HEV-1 is associated with increased apoptosis and necrosis at the maternal-fetal interface with alterations of the placental barrier architecture. HEV-associated tissue apoptosis and necrosis

have been previously reported in liver biopsies of infected patients and animal models^{17,18,41}. Whilst, the origin of this tissue injury remains elusive a recent study suggested that it might involve mitochondrial damage and/or activation of the caspase family members⁴¹. Our results revealed also that HEV-1 infection alters the secretion profile of decidual/placental tissues and cells. These findings are consistent with data correlating the increase of several pro-inflammatory factors in the peripheral blood from HEV-1 infected women with adverse pregnancy outcomes⁴². Under steady state conditions, the secretome within the female reproductive tract and gestational tissue is finely tuned to support embryo implantation, placental development, and fetal immune tolerance. Conversely, an uncontrolled, prolonged, or excessive mediator secretion in response to viral infection has previously been associated with tissue injury and adverse pregnancy outcomes^{19-22,43}. Indeed, a pro-inflammatory microenvironment may lead to the recruitment and activation/differentiation of pro-inflammatory cells and/or additional viral targets^{44,45}. Consequently, a positive feedback loop can be established and exacerbates the local response, further amplifying tissue damage and viral spread. By modulating cytokine and chemokine expression, HEV may also alter leukocyte chemotaxis resulting in ineffective immune response and impaired viral clearance. In addition to elevated local inflammation, defective or inadequate placental development may explain HEV-1-associated pregnancy disorders. For instance, the HEV-1 associated decrease of CXCL10 could impair the invasion/migration of the fetal trophoblast and remodeling of maternal spiral arteries, both of which are mandatory for successful placentation⁴⁶⁻⁴⁹. Our findings that conditioned media from infected samples induces tissue damage even in the absence of viral replication further highlight the involvement of the local environment in HEV-1 pathogenicity and underscore the importance of host factors that can also promote viral pathogenicity^{17,45}. However, we cannot exclude the contribution of viral capsid protein and/or RNA in the induction and/or promotion of the release of soluble mediators. Nevertheless, the greater effects with HEV-1 clinical strain would suggest that both virus- and host-related factors contribute to the viral pathogenesis during pregnancy.

Despite the scarce information concerning HEV-3 during pregnancy, the lack of clinical manifestations suggests that the pro-inflammatory response to HEV-3 may correspond to a minor bystander effect that is harmless to fetal development. It's also possible that elements of the maternal immune system might limit HEV-3 replication at the maternal-fetal interface avoiding any pregnancy complications. As a matter of fact, we have previously demonstrated that Natural Killer cells from the maternal innate immune system can control

the replication of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus, preventing the development of congenital infection^{29,50}.

Most of pregnancy diseases related to HEV-1 infection have been reported mainly in the second and third trimester. Lessons learned from the TORCH pathogens have demonstrated that infections during early pregnancy are highly detrimental to fetal development. However, HEV-1 induced illness during the first trimester has not been well documented although it might be detrimental for pregnancy outcome. Even if our *ex vivo* model of first trimester pregnancy, similar to any other experimental model, has its limits, our findings within this model are the first suggesting that HEV-1 infection in early pregnancy may result in clinical symptoms that can be intermingled with pregnancy disorders such as spontaneous abortion or preeclampsia. The immunological and hormonal changes in later terms may then worsen the outcome of the pregnancy. Additional studies using samples from term pregnancy and/or *in utero* infected women as well as other viral strains warrant further investigations to fulfill our understanding of HEV pathogenicity.

In summary, our data suggest that the viral tropism and efficient replication combined with abnormal pro-inflammatory cytokine and chemokine secretion dictate the extent of tissue damage at the maternal-fetal interface and might be responsible for HEV-1-associated pregnancy disorders (Fig.9). Beyond providing an explanatory mechanism for the severity of HEV-1 infection during pregnancy, we now present a new experimental model to study HEV infection, setting the stage for the testing and development of novel therapeutic strategies directed towards supporting human pregnancy.

Methods

Ethics Statement

This study was approved by the South-West & Outmer II ethical committee and was registered at the Ministry of Higher Education and Research (number DC-2016-2772). All participants provided prior written informed consent in agreement with the guidelines of the Declaration of Helsinki with experiments performed in accordance with approved guidelines.

Tissue Culture and Isolation of Primary Cells

First trimester pregnancy samples (8–12 weeks of pregnancy) were obtained from healthy women (aged 18–30 years) following an elective vaginal termination of pregnancy⁵¹. Briefly, 0.3 cm² of tissue explant was prepared from the *decidua basalis* (decidua) and placenta and maintained for up to two weeks in DMEM:F-12 supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). Matched decidua and placenta samples were used in all the experiments.

For primary cell isolation, matrix digestion and cellular disaggregation were achieved with a 45 min (37°C) digest with the enzyme, collagenase IV (Sigma-Aldrich, France). Mononuclear cells were then isolated from the cell suspension by Ficoll-Hypaque density gradient separation (Amersham Biotech) and plated overnight at 37°C. Fibroblast-like stromal cells were enriched by successive rounds of mild trypsinization²⁹. Human hepatocellular carcinoma HepG2/C3A cell line (ATCC CRL-10741) was maintained in DMEM culture medium supplemented with 10% FCS.

HEV Clinical Strains and Infection Protocol

HEV-1 and HEV-3 clinical strains were obtained at the acute phase of infection from the feces of a traveler returning from India and an autochthonous infected patient respectively. Patients were tested negative for HIV and Hepatitis A, B and C. Fecal samples were diluted in DMEM and centrifuged at 1200g for 10 min. Viral strains were recovered from the supernatant and passed through a 22µm filter. HEV RNA was quantified by RT-qPCR with aliquots stored at -80°C until use. Matched decidua and placenta explants were infected with the same HEV-1 or HEV-3 clinical strain.

Tissue were infected over a 24h period (at 35.5°C) with 2×10^7 copies of HEV-1 or HEV-3 RNA (~MOI 10) in a 24 well plate and a final volume of 500µl of DMEM:F-12 supplemented with 2% FCS; mock controls comprised uninfected explants. Each explant is then washed 5

times in PBS. The explants are then laid on collagen sponges in DMEM:F-12 supplemented with 10% FCS and cultured at 37°C and 5% CO₂ humidified atmosphere³⁰.

Prior to infection, primary stromal cells isolated from either the decidua or placenta and HepG2/C3A cells were seeded in 6-well plates overnight (5×10^5 cells /well). Cells were then infected with 10^7 RNA copies of either HEV-1, HEV-3 (~MOI 20), or were left uninfected in a final volume of 1ml of DMEM:F-12 containing 2% FCS at 35.5°C. After 24h, the cell layer was rinsed 5 times with PBS and subsequently cultured in 2% FCS-medium at 35.5°C.

At different time points post-infection, half of the cell culture supernatant was harvested and replaced with fresh media. Supernatants were stored at -80°C for subsequent quantification of viral RNA and soluble mediators. For viral production kinetics, day 0 supernatant was collected after wash before culture. The residual value obtained for day 0 was subtracted from each kinetic point. Residual day 0 values were 1×10^5 copies/ml and 3×10^5 copies /ml for decidua and placenta respectively, regardless of the genotype.

HEV Quantification

HEV RNA was extracted from culture supernatants using the QiaAmp viral RNA mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). The RNA quantification was performed using one-step, real-time RT-PCR with a LightCycler 480 instrument (Roche Diagnostics, France). The following primers targeting the ORF2/ORF3 overlapping region were used: Forward primer (5'-GGTGGTTTCTGGGGTGAC-3'), Reverse primer (5'-AGGGGTTGGTTGGATGAA-3') and the probe 5'-6-carboxyfluorescein (FAM)-TGATTCTCAGCCCTTCGC-6-carboxytetramethylrhodamine (TAMRA)-3'. The amplification efficiency was then calculated using the standard curve. RNA standards were designed using a conserved fragment within the ORF3 gene (70 nt) amplified from an HEV infected patient sample and cloned into pGEM.3Z vector. The fragment was then retro-transcribed using T7 RNA polymerase. The obtained positive strand was used as the RNA standard in all the quantitative RT-PCR experiments. A standard curve was generated from the serial 10-fold dilutions of this RNA standard^{52,53}. Data for normalized RT-qPCR values were presented as viral RNA copies/mL. The detection limit for this validated method is 100 HEV RNA copies/mL.

Histological analyses

After five days, mock, HEV-1, or HEV-3 infected decidual or placental tissue explants were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, and then 3-micron thick sections processed for histological analyses using hematoxylin and eosin (H&E) staining, *in situ*

hybridization (ISH) and Terminal deoxynucleotidyle transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) assay. Histology slides were scanned using the Panoramic 250 Flash system (3DHISTECH, Hungary). Images were processed using the Panoramic Viewer software (3DHISTECH, Hungary). The quantification of necrosis (H&E staining) in infected samples versus mock-infected controls was performed in ten high power fields per sample taken randomly.

For ISH of HEV RNA, tissue sections were processed according to the manufacturer's protocol (Advanced Cell Diagnostics, USA). The commercially available HEV-specific probes (V-HEV) were used to detect the positive strand RNA. RNase-free conditions were maintained during all steps. Slides were scanned using 40x objective. For ISH quantification, the number of HEV positive cells was counted in ten random regions that cover the whole slide and then reported to the area (cm²) of each region.

The apoptotic cells were detected *in situ* by TUNEL assay using a Cell Death Detection Kit, TMR red (Sigma-Aldrich, France). The sections were processed according to the manufacturer's directions. The slides were further stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1:5,000 dilution, Sigma). Histology slides were scanned using 20x objective. Apoptotic cells with red plot within the nuclei and normal cells with blue nuclei were identified in the processed sections. The quantification of apoptosis in infected samples versus mock-infected controls was performed in ten high power fields per sample taken randomly.

Quantification of Soluble Factors

Culture supernatants were harvested two days post-infection and stored at -80°C for quantification of soluble mediators. Seventeen-multiplexed Affymetrix cytokine assays (Procarta/eBioscience, France) were used to quantify cytokines (IL-6, IL-15, IL-18, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TNF- α and sICAM-1), chemokines (CCL-3, CCL-4, CCL-5, and CXCL-10), growth factors (G-CSF, GM-CSF, and VEGF-A), and metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) according to the manufacturer's protocol. Interferons assessment was conducted by Cytometric Bead Array (CBA) using the Human Type 1/2/3 Interferon Panel (5-plex) (Biolegend, USA) according to the manufacturer's protocol.

Principal component analysis (PCA)

PCA of IL-6, CCL-3, CCL-4 and CXCL-10 in both decidual and placental tissues were performed using ClustVis web tool (<http://biit.cs.ut.ee/clustvis/>). Values were centered,

unit variance scaling was applied to rows and single value decomposition with imputation was used to calculate principal components.

Preparation of Conditioned Medium (CM)

Mock, HEV-1, or HEV-3 infected decidual or placental explant supernatants were collected five days post-infection and then UV-irradiated for 30 min using Spectroline EF-140/F UV lamp (220 Volts, 50 HZ, 17 Amps). The UV treatment was sufficient to abolish viral infection. Fresh decidual and placental explants were then cultured for five days in decidual UV-CM and placental UV-CM, respectively, before further analyses.

Immunocytochemistry and Fluorescence Microscopy

Primary decidual and placental stromal cells or HepG2/C3A cells were plated on glass coverslips and then infected with either HEV-1, HEV-3, or were left uninfected. Seven days post-infection, cells were fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.3% Triton X-100, and stained with antibodies against the HEV capsid protein (anti-ORF2, clones 1E6 and 4B2, 1:200 dilution, Clinisciences) and vimentin, a stromal cell marker (1:100 dilution, Cell Signaling Technology) for primary cells or α -tubulin for HepG2/C3A cells (1:250 dilution, Sigma-Aldrich). Bound primary antibodies were visualized by the addition of Alexa Fluor-conjugated, class specific secondary antibodies (1:500 dilution, Invitrogen). Nuclei were stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1:5,000 dilution, Sigma-Aldrich). Z-stack images were acquired using an LSM710 confocal microscope (Carl Zeiss, Germany) with 63x oil objective. Images were processed using the Imaris software (Bitplane AG, Switzerland).

Identification of Infectious Progeny Virions

Culture supernatants were collected from HEV-1 or HEV-3 infected explants five days post-infection with viral load quantified by RT-qPCR. Freshly isolated stromal cells, or the HepG2/C3A cell line (ATCC CRL-10741), were then infected with 5×10^5 RNA copies from each supernatant. After extensive washing, viral replication was followed over a two-week period as described above.

Ribavirin and Interferon treatment

Ribavirin (RBV) and recombinant IFN- λ 1 and IFN- λ 2 were purchased from Sigma-Aldrich and Peprotech France respectively. Tissue explants were treated with 50 μ M of RBV or 100

ng/mL of IFN- λ after HEV infection and were maintained in tissue culture until the end point of the experiment.

Statistical Analyses

All experiments were conducted on matched decidua and placenta samples from the same donor. The total number of independent donors for each experiment is indicated in the figure legend. Graphs represent mean values with error bars indicating the S.E.M. Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism software 5 (GraphPad Software, La Jolla, USA). Two-way analysis of variance (ANOVA) with the Bonferroni post-hoc test was used to compare the kinetics of HEV-1 and HEV-3 viral production in tissue explants, and in isolated primary cells from the same donors. Repeated measures ANOVA with the Tukey post-hoc test was used to compare values for mock, HEV-1, and HEV-3 infected samples from the same donors. Correlations between soluble factor secretion and viral production were calculated with Spearman's rank correlation test. (*) denotes a statistical comparison made between HEV-1 and HEV-3 infected tissues or cells. (#) denotes a statistical comparison made between mock and HEV-1 or HEV-3 infected tissues or cells. P values <0.05 were considered to be significant (*/# P<0.05; **/## P<0.01; ***/### P<0.001).

Data availability

The authors declare that all the data supporting the findings of this study are available within the article and its supplementary information files, or are available upon reasonable request to the authors.

References

- 1 Purdy, M. A. *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Hepeviridae. *J Gen Virol* **98**, 2645-2646, doi:10.1099/jgv.0.000940 (2017).
- 2 Kamar, N., Dalton, H. R., Abravanel, F. & Izopet, J. Hepatitis E virus infection. *Clin Microbiol Rev* **27**, 116-138, doi:10.1128/CMR.00057-13 (2014).
- 3 Lee, G. H. *et al.* Chronic Infection With Camelid Hepatitis E Virus in a Liver Transplant Recipient Who Regularly Consumes Camel Meat and Milk. *Gastroenterology* **150**, 355-357 e353, doi:10.1053/j.gastro.2015.10.048 (2016).
- 4 Perez-Gracia, M. T., Suay-Garcia, B. & Mateos-Lindemann, M. L. Hepatitis E and pregnancy: current state. *Rev Med Virol*, doi:10.1002/rmv.1929 (2017).
- 5 Goldenberg, R. L., Hauth, J. C. & Andrews, W. W. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med* **342**, 1500-1507, doi:10.1056/NEJM200005183422007 (2000).
- 6 Silasi, M. *et al.* Viral infections during pregnancy. *Am J Reprod Immunol* **73**, 199-213, doi:10.1111/aji.12355 (2015).
- 7 Adams Waldorf, K. M. & McAdams, R. M. Influence of infection during pregnancy on fetal development. *Reproduction* **146**, R151-162, doi:10.1530/REP-13-0232 (2013).
- 8 Anty, R. *et al.* First case report of an acute genotype 3 hepatitis E infected pregnant woman living in South-Eastern France. *J Clin Virol* **54**, 76-78, doi:10.1016/j.jcv.2012.01.016 (2012).
- 9 Tabatabai, J. *et al.* First case report of an acute hepatitis E subgenotype 3c infection during pregnancy in Germany. *J Clin Virol* **61**, 170-172, doi:10.1016/j.jcv.2014.06.008 (2014).
- 10 Andersson, M. I., Hughes, J., Gordon, F. H., Ijaz, S. & Donati, M. Of pigs and pregnancy. *Lancet* **372**, 1192, doi:10.1016/S0140-6736(08)61486-5 (2008).
- 11 Lhomme, S. *et al.* Hepatitis E Pathogenesis. *Viruses* **8**, doi:10.3390/v8080212 (2016).
- 12 Le Bouteiller, P. *et al.* The human decidual NK-cell response to virus infection: what can we learn from circulating NK lymphocytes? *J Reprod Immunol* **88**, 170-175, doi:10.1016/j.jri.2010.12.005 (2011).
- 13 Bose, P. D. *et al.* Evidence of extrahepatic replication of hepatitis E virus in human placenta. *J Gen Virol* **95**, 1266-1271, doi:10.1099/vir.0.063602-0 (2014).
- 14 Debing, Y. *et al.* Ribavirin inhibits in vitro hepatitis E virus replication through depletion of cellular GTP pools and is moderately synergistic with alpha interferon. *Antimicrob Agents Chemother* **58**, 267-273, doi:10.1128/AAC.01795-13 (2014).
- 15 Weisblum, Y. *et al.* Zika Virus Infects Early- and Midgestation Human Maternal Decidual Tissues, Inducing Distinct Innate Tissue Responses in the Maternal-Fetal Interface. *J Virol* **91**, doi:10.1128/JVI.01905-16 (2017).
- 16 Schleiss, M. R., Aronow, B. J. & Handwerger, S. Cytomegalovirus infection of human syncytiotrophoblast cells strongly interferes with expression of genes involved in placental differentiation and tissue integrity. *Pediatr Res* **61**, 565-571, doi:10.1203/pdr.0b013e318045be6d (2007).
- 17 Agrawal, V., Goel, A., Rawat, A., Naik, S. & Aggarwal, R. Histological and immunohistochemical features in fatal acute fulminant hepatitis E. *Indian J Pathol Microbiol* **55**, 22-27, doi:10.4103/0377-4929.94849 (2012).
- 18 Lenggenhager, D. & Weber, A. An Update on the Clinicopathologic Features and Pathologic Diagnosis of Hepatitis E in Liver Specimens. *Adv Anat Pathol* **25**, 273-281, doi:10.1097/PAP.0000000000000195 (2018).
- 19 Jabrane-Ferrat, N. & Siewiera, J. The up side of decidual natural killer cells: new developments in immunology of pregnancy. *Immunology* **141**, 490-497, doi:10.1111/imm.12218 (2014).

- 20 Lash, G. E. & Ernerudh, J. Decidual cytokines and pregnancy complications: focus on spontaneous miscarriage. *J Reprod Immunol* **108**, 83-89, doi:10.1016/j.jri.2015.02.003 (2015).
- 21 Prins, J. R., Gomez-Lopez, N. & Robertson, S. A. Interleukin-6 in pregnancy and gestational disorders. *J Reprod Immunol* **95**, 1-14, doi:10.1016/j.jri.2012.05.004 (2012).
- 22 Vinketova, K., Mourdjeva, M. & Oreshkova, T. Human Decidual Stromal Cells as a Component of the Implantation Niche and a Modulator of Maternal Immunity. *J Pregnancy* **2016**, 8689436, doi:10.1155/2016/8689436 (2016).
- 23 van de Garde, M. D. B. *et al.* Interferon-alpha treatment rapidly clears Hepatitis E virus infection in humanized mice. *Sci Rep* **7**, 8267, doi:10.1038/s41598-017-07434-y (2017).
- 24 Sayed, I. M. *et al.* Study of hepatitis E virus infection of genotype 1 and 3 in mice with humanised liver. *Gut*, doi:10.1136/gutjnl-2015-311109 (2016).
- 25 Yin, X. *et al.* Hepatitis E virus persists in the presence of a type III interferon response. *PLoS Pathog* **13**, e1006417, doi:10.1371/journal.ppat.1006417 (2017).
- 26 Devhare, P. B., Desai, S. & Lole, K. S. Innate immune responses in human hepatocyte-derived cell lines alter genotype 1 hepatitis E virus replication efficiencies. *Sci Rep* **6**, 26827, doi:10.1038/srep26827 (2016).
- 27 Xu, L. *et al.* RIG-I is a key antiviral interferon-stimulated gene against hepatitis E virus regardless of interferon production. *Hepatology* **65**, 1823-1839, doi:10.1002/hep.29105 (2017).
- 28 Corry, J., Arora, N., Good, C. A., Sadovsky, Y. & Coyne, C. B. Organotypic models of type III interferon-mediated protection from Zika virus infections at the maternal-fetal interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, 9433-9438, doi:10.1073/pnas.1707513114 (2017).
- 29 Siewiera, J. *et al.* Human cytomegalovirus infection elicits new decidual natural killer cell effector functions. *PLoS Pathog* **9**, e1003257, doi:10.1371/journal.ppat.1003257 (2013).
- 30 El Costa, H. *et al.* ZIKA virus reveals broad tissue and cell tropism during the first trimester of pregnancy. *Sci Rep* **6**, 35296, doi:10.1038/srep35296 (2016).
- 31 Pagani, I. *et al.* Human Endometrial Stromal Cells Are Highly Permissive To Productive Infection by Zika Virus. *Sci Rep* **7**, 44286, doi:10.1038/srep44286 (2017).
- 32 Tanaka, T., Takahashi, M., Kusano, E. & Okamoto, H. Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus. *J Gen Virol* **88**, 903-911, doi:10.1099/vir.0.82535-0 (2007).
- 33 Yin, X., Li, X. & Feng, Z. Role of Envelopment in the HEV Life Cycle. *Viruses* **8**, doi:10.3390/v8080229 (2016).
- 34 Cartwright, J. E. & Whitley, G. S. Strategies for investigating the maternal-fetal interface in the first trimester of pregnancy: What can we learn about pathology? *Placenta*, doi:10.1016/j.placenta.2017.05.003 (2017).
- 35 Bose, P. D. *et al.* High viral load and deregulation of the progesterone receptor signaling pathway: association with hepatitis E-related poor pregnancy outcome. *J Hepatol* **54**, 1107-1113, doi:10.1016/j.jhep.2010.08.037 (2011).
- 36 Fisher, S., Genbacev, O., Maidji, E. & Pereira, L. Human cytomegalovirus infection of placental cytotrophoblasts in vitro and in utero: implications for transmission and pathogenesis. *J Virol* **74**, 6808-6820, doi:10.1128/JVI.74.15 (2000).
- 37 Nair, V. P. *et al.* Endoplasmic Reticulum Stress Induced Synthesis of a Novel Viral Factor Mediates Efficient Replication of Genotype-1 Hepatitis E Virus. *PLoS Pathog* **12**, e1005521, doi:10.1371/journal.ppat.1005521 (2016).
- 38 Nan, Y. *et al.* Hepatitis E virus inhibits type I interferon induction by ORF1 products. *J Virol* **88**, 11924-11932, doi:10.1128/JVI.01935-14 (2014).

- 39 Dong, C. *et al.* Suppression of interferon-alpha signaling by hepatitis E virus. *Hepatology* **55**, 1324-1332, doi:10.1002/hep.25530 (2012).
- 40 Kneegendorf, L. *et al.* Hepatitis E virus replication and interferon responses in human placental cells. *Hepatol Commun* **2**, 173-187, doi:10.1002/hep4.1138 (2018).
- 41 Soomro, M. H. *et al.* Antigen detection and apoptosis in Mongolian gerbil's kidney experimentally intraperitoneally infected by swine hepatitis E virus. *Virus Res* **213**, 343-352, doi:10.1016/j.virusres.2015.12.012 (2016).
- 42 Kumar, A. *et al.* Association of cytokines in hepatitis E with pregnancy outcome. *Cytokine* **65**, 95-104, doi:10.1016/j.cyto.2013.09.022 (2014).
- 43 Tisoncik, J. R. *et al.* Into the eye of the cytokine storm. *Microbiol Mol Biol Rev* **76**, 16-32, doi:10.1128/MMBR.05015-11 (2012).
- 44 Shi, C. & Pamer, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* **11**, 762-774, doi:10.1038/nri3070 (2011).
- 45 Drebbler, U. *et al.* Hepatitis E in liver biopsies from patients with acute hepatitis of clinically unexplained origin. *Front Physiol* **4**, 351, doi:10.3389/fphys.2013.00351 (2013).
- 46 Strieter, R. M. *et al.* The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem* **270**, 27348-27357, doi:10.1074/jbc.270.45.27348 (1995).
- 47 Charo, I. F. & Ransohoff, R. M. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* **354**, 610-621, doi:10.1056/NEJMra052723 (2006).
- 48 Hanna, J. *et al.* Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med* **12**, 1065-1074, doi:10.1038/nm1452 (2006).
- 49 Sharma, S., Godbole, G. & Modi, D. Decidual Control of Trophoblast Invasion. *Am J Reprod Immunol* **75**, 341-350, doi:10.1111/aji.12466 (2016).
- 50 Quillay, H. *et al.* NK cells control HIV-1 infection of macrophages through soluble factors and cellular contacts in the human decidua. *Retrovirology* **13**, 39, doi:10.1186/s12977-016-0271-z (2016).
- 51 El Costa, H. *et al.* Critical and differential roles of NKp46- and NKp30-activating receptors expressed by uterine NK cells in early pregnancy. *J Immunol* **181**, 3009-3017, doi:10.4049/jimmunol.181.5.3009 (2008).
- 52 Abravanel, F. *et al.* Genotype 3 diversity and quantification of hepatitis E virus RNA. *J Clin Microbiol* **50**, 897-902, doi:10.1128/JCM.05942-11 (2012).
- 53 Chapuy-Regaud, S. *et al.* Characterization of the lipid envelope of exosome encapsulated HEV particles protected from the immune response. *Biochimie* **141**, 70-79, doi:10.1016/j.biochi.2017.05.003 (2017).

Acknowledgments:

The authors would like to thank MDs from the maternity hospitals, the histopathology core facility-UMS-US006 (T. Al-Saati and F. Capilla), and the CPTP cell imaging core facility (S. Allart). This work was supported by INSERM, CNRS, and Toulouse III University (to N.J.-F., J.I.), and ANRS (ECTZ2844 to N.J.-F.). J.G. and Q.C. are recipient of the ANRS, and the Chinese Scholarship Council PhD fellowships.

Author contributions:

J.G. designed the study and conducted experiments; Q.C., and J.S. conducted experiments. M.D. provided technical assistance; G.C. and C.L. provided the requisite clinical material for this study; J.I. and R.A.D. provided critical feedback; N.J.F. and H.E.C. jointly conceived and supervised this study, and wrote the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

Competing financial interests :

The authors declare no competing interests.

Materials & correspondence:

Nabila Jabrane-Ferrat, PhD, INSERM U1043, CNRS UMR5282, Université Toulouse III, 31024 Toulouse, France; fax: (33) 562-74-45-58. e-mail: nabila.jabrane-ferrat@inserm.fr.

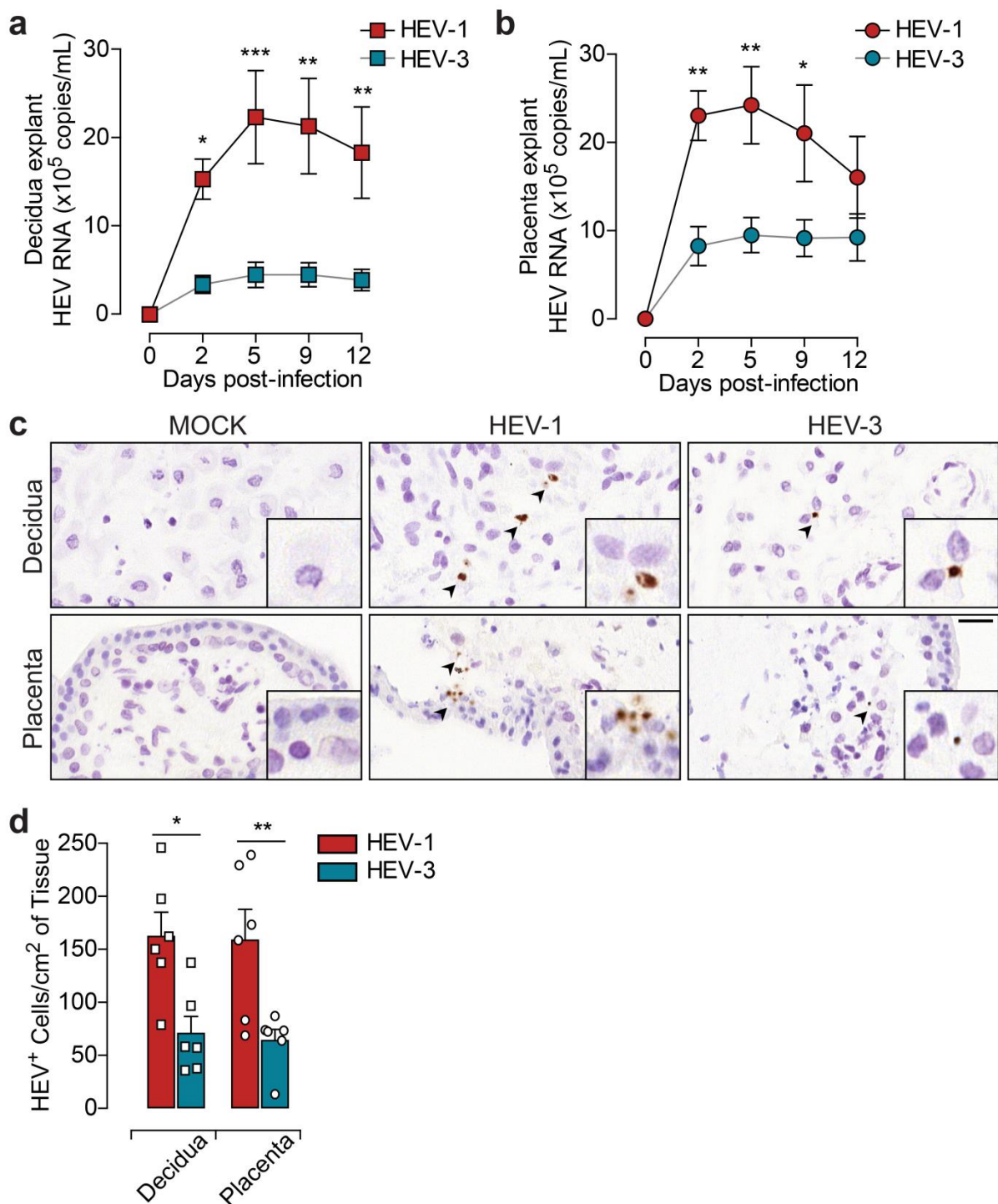


Figure 1. HEV-1 replicates efficiently in decidual and placental tissues. (a,b) Kinetics of HEV virus production from explants established from the decidua (a) and placenta (b), infected with HEV-1 (red), or HEV-3 (cyan). RNA levels were measured in tissue culture supernatants by RT-qPCR. (c,d) Histological analyses of tissue sections stained by HEV *in situ* hybridization (ISH) and prepared from mock, HEV-1, or HEV-3 infected explants five days post-infection. (c) Representative field of view of explant material derived from the decidua (upper panel) and placenta (lower panel). Arrowheads point to HEV positive cells (in

brown) and boxes represent enlarged areas with characteristic staining patterns. Scale bar, 20µm. **(d)** Bar graph illustrating the number of HEV positive cells per cm² of tissue determined by ISH staining in HEV-1 (red) or HEV-3 (cyan) infected tissue explants. Data represent mean values \pm S.E.M. of six independent donors. (*) denotes a statistical comparison between HEV-1 and HEV-3 infected tissues. * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001 by two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test **(a,b)** and paired t-test **(d)**.

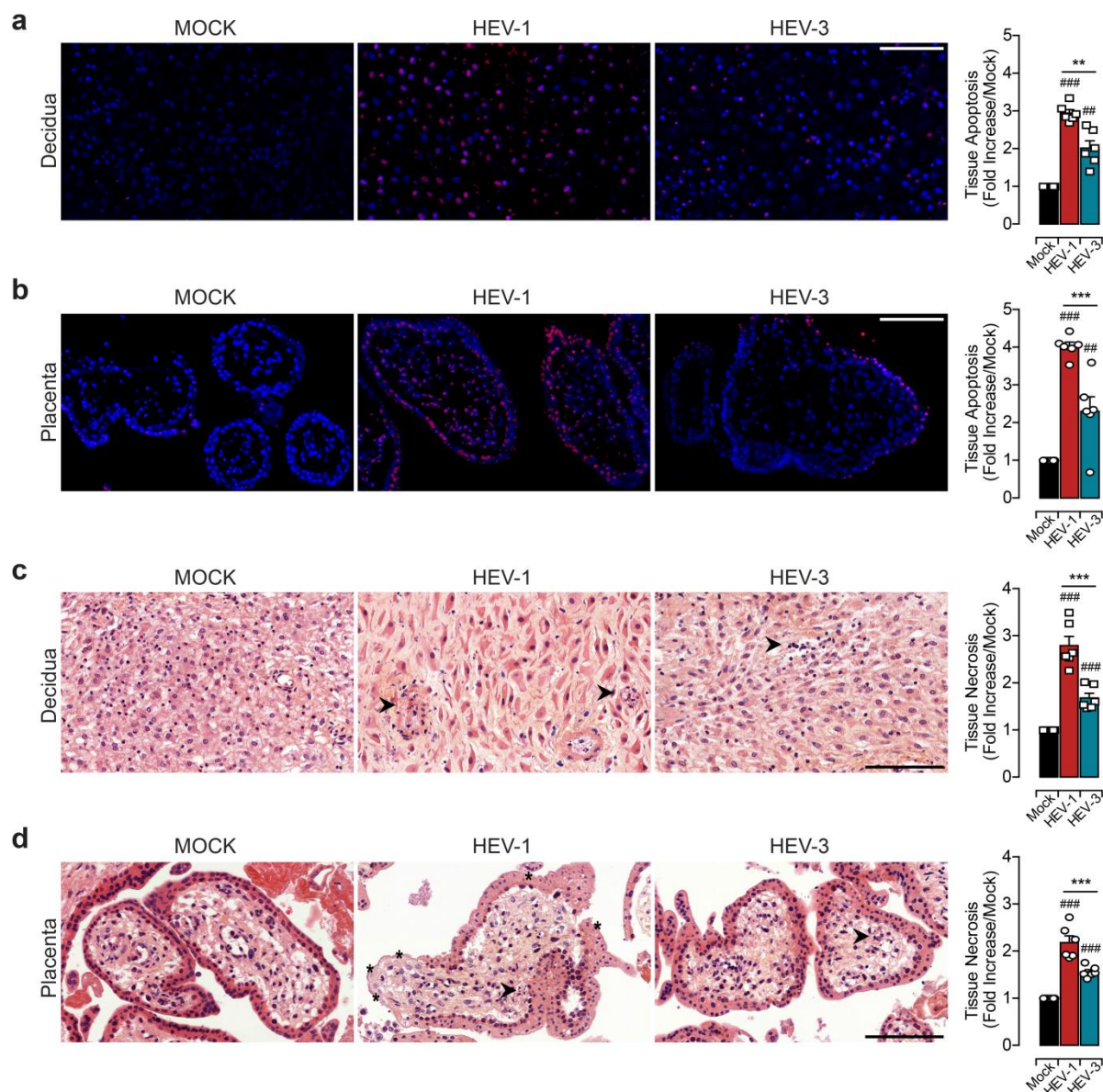


Figure 2. HEV-1 causes severe injury in decidual and placental tissues. Histological analyses of apoptosis (TUNEL staining, **a,b**) and necrosis (H&E staining, **c,d**) and in explants sections prepared from mock, HEV-1, or HEV-3 infected tissues, five days post-infection. (**a,b**) Representative large field of view of TUNEL stained sections prepared from the decidua (**a**) and placenta (**b**). Staining indicates the apoptotic cells (red) and nuclei (blue). Scale bar, 100µm. Bar graph illustrates the increase of tissue apoptosis in HEV-1 (red) or HEV-3 (cyan) infected tissue explants, compared to levels detected in mock infected tissue explants (black) and represented as fold increase. (**c,d**) Representative large field of view of H&E stained sections prepared from the decidua (**c**) and placenta (**d**). Arrowheads point to necrotic zones with nuclear changes illustrated by pyknosis, karyorrhexis, and karyolysis. Stars indicate an injured syncytiotrophoblast layer. Scale bar, 100µm. Bar graph illustrates the increase of

tissue necrosis in HEV-1 (red) or HEV-3 (cyan) infected tissue explants, compared to levels detected in mock infected tissue explants (black) and represented as fold increase. Data represent mean values \pm S.E.M. of six independent donors. (*) denotes a statistical comparison between HEV-1 and HEV-3 infected tissues and (#) represents a statistical comparison between mock and HEV-1 or HEV-3 infected tissues. **/## P<0.01; ***/### P<0.001 by repeated measures ANOVA with Tukey post-hoc test.

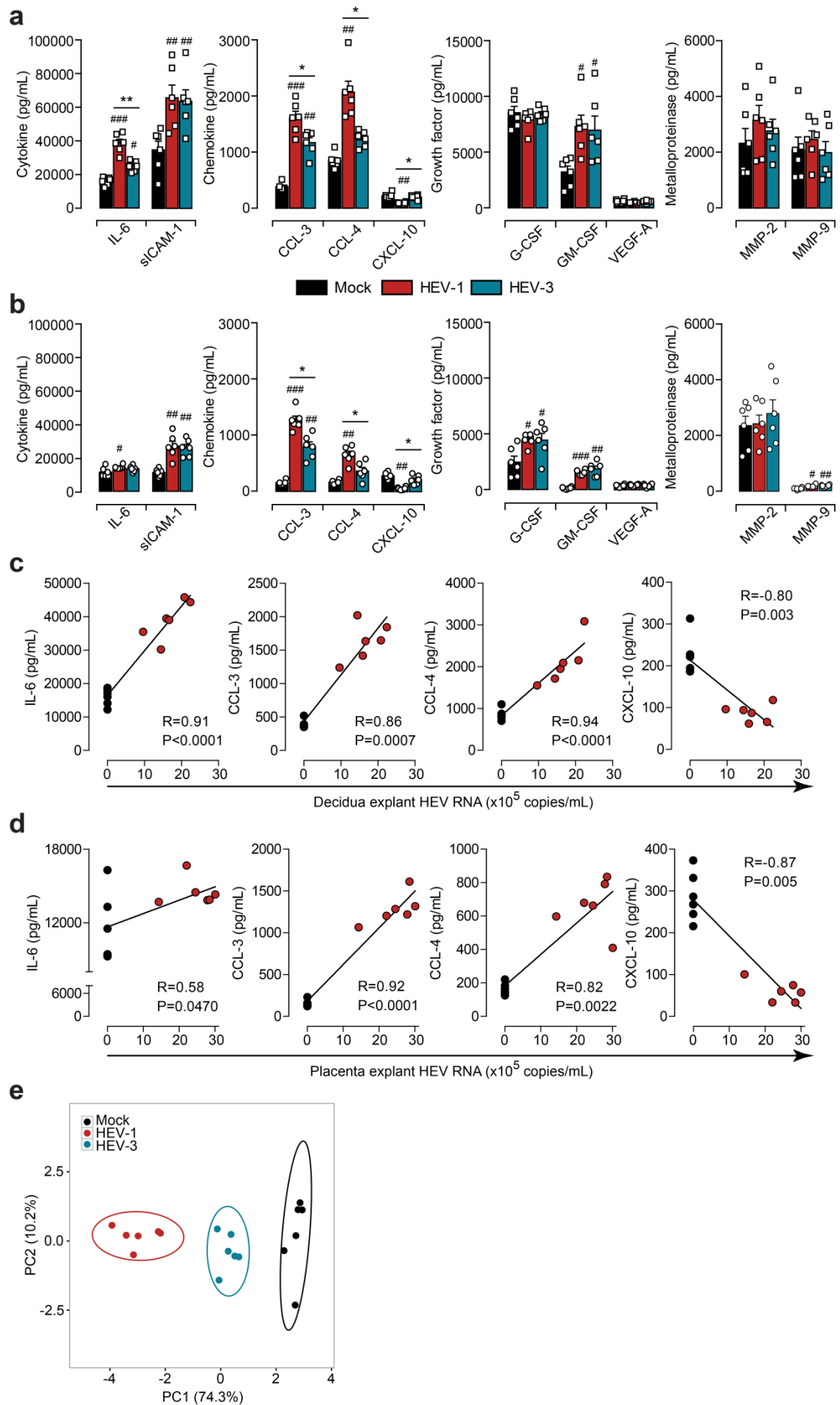


Figure 3. HEV-1 infection of decidual and placental tissues skews their secretory function. (a,b) Cytokine, chemokine, growth factor, and metalloproteinase secretion from explants established from either decidua (a) or placenta (b), measured by multiplex assay in culture supernatants two days after infection with HEV-1 (red) or HEV-3 (cyan). Black bars represent mock-infected tissues. (c,d) Correlation between IL-6, CCL-3, CCL-4 or CXCL10 secretion and viral production in the decidua (c) and placenta (d) two days after HEV-1 infection. Black and red points represent mock-, and HEV-1-infected tissues respectively. The Spearman's rank correlation test P value and R coefficient are indicated in each graph. (e) Principal component analysis (PCA) of IL-6, CCL-3, CCL-4, and CXCL-10 secretion in the decidua and placenta, two days after mock (black), HEV-1 (red), or HEV-3 (cyan) infection. Values were centered, unit variance scaling was applied to rows and single value decomposition with imputation was used to calculate principal components. X and Y axis show PC1 and PC2 that explain 74.3% and 10.2% of the total variance, respectively. Prediction ellipses are such that, with probability of 0.95, a new observation from the same group will fall inside the ellipse. Data represent mean values \pm S.E.M. of six independent donors. (*) denotes a statistical comparison between HEV-1 and HEV-3 infected tissue. (#) represents a statistical comparison between mock and HEV-1 or HEV-3 infected tissues. */# P<0.05; **/### P<0.01; #### P<0.001 by repeated measures ANOVA with Tukey post-hoc test.

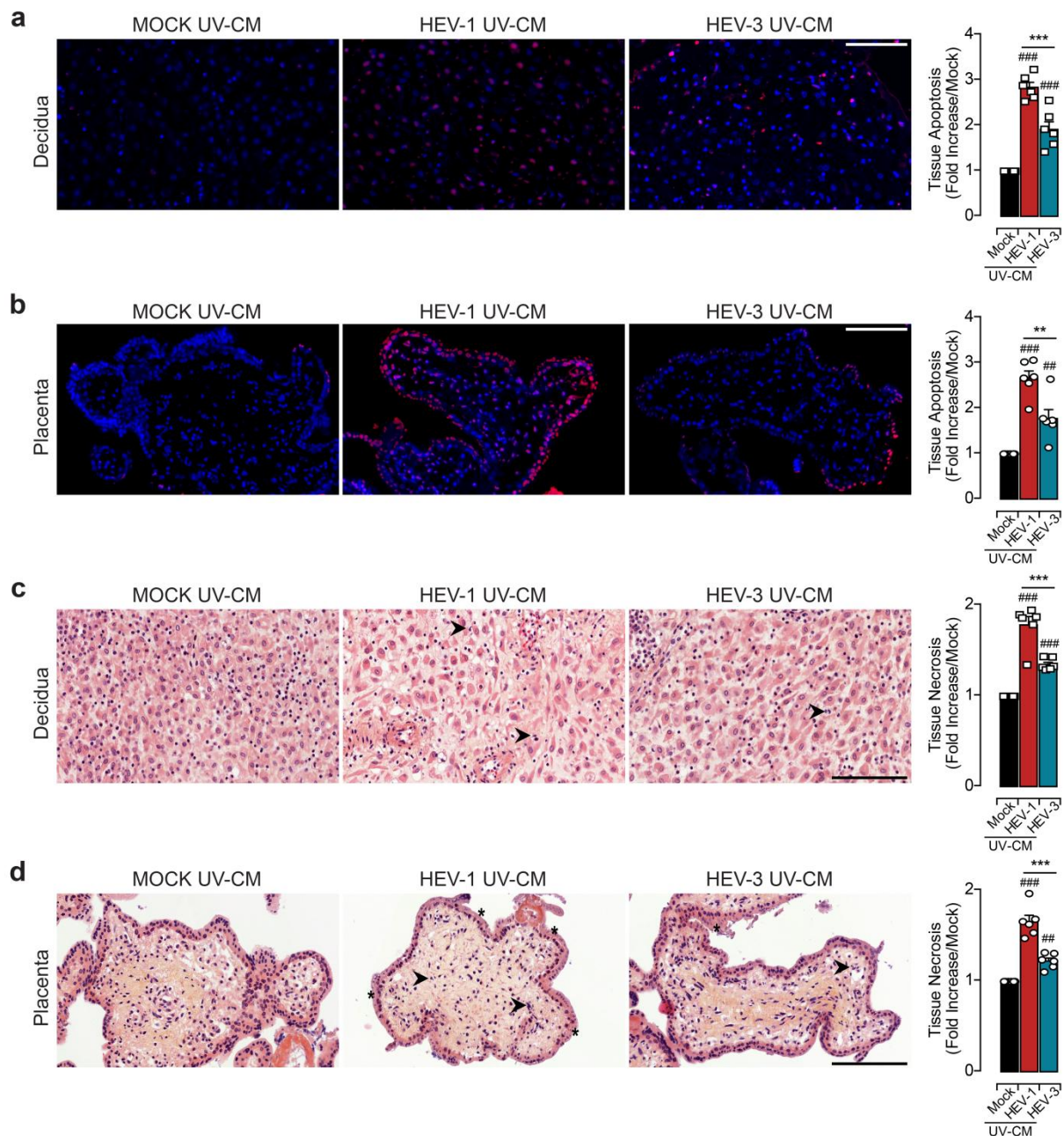


Figure 4. HEV-1 altered secretome contributes to tissue damage. Histological analyses of apoptosis (TUNEL staining, **a,b**) and necrosis (H&E staining, **c,d**) and in explants sections prepared from tissues challenged for five days with either Mock, HEV-1 or HEV-3 UV-irradiated conditioned media (CM). (**a,b**) Representative large field of view of TUNEL stained sections prepared from the decidua (**a**) and placenta (**b**). Staining indicates the apoptotic cells (red) and nuclei (blue). Scale bar, 100µm. Bar graph illustrates the increase of tissue apoptosis in explants challenged for five days with either HEV-1 (red) or HEV-3 (cyan) UV-CM. Results are normalized to data obtained using UV-CM harvested from mock-infected explants (black) and represented as fold increase. (**c,d**) Representative large field of

view of H&E stained sections prepared from the decidua (**c**) and placenta (**d**). Arrowheads point to necrotic zones with nuclear changes illustrated by pyknosis, karyorrhexis, and karyolysis. Stars indicate an injured syncytiotrophoblast layer. Scale bar, 100 μ m. Bar graph illustrates the increase of tissue necrosis in explants challenged for five days with either HEV-1 (red) or HEV-3 (cyan) UV-CM. Results are normalized to data obtained using UV-CM harvested from mock-infected explants (black) and represented as fold increase. Data represent mean values \pm S.E.M. of six independent donors. (*) denotes a statistical comparison between HEV-1 and HEV-3 infected tissues and (#) represents a statistical comparison between mock and HEV-1 or HEV-3 infected tissues. **/## P<0.01; ***/### P<0.001 by repeated measures ANOVA with Tukey post-hoc test.

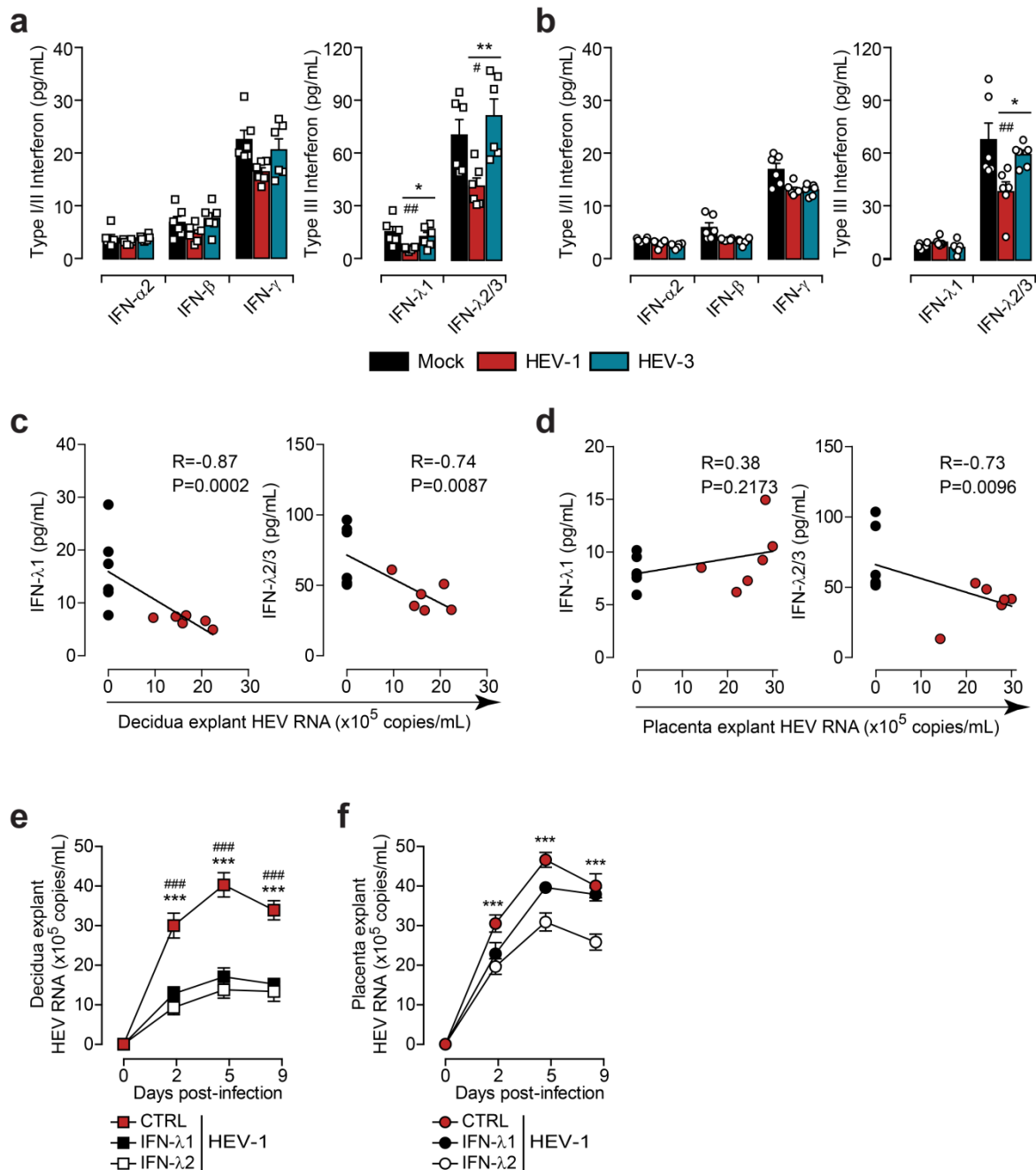


Figure 5. HEV-1 replication is associated with a decrease in type III interferon levels. (a,b) Type I/II and type III interferon secretion from explants established from either decidua (a) or placenta (b), measured by cytometric bead array in culture supernatants two days after infection with HEV-1 (red) or HEV-3 (cyan). Black bars represent mock-infected tissues. Data represent mean values \pm S.E.M. of six independent donors. (*) denotes a statistical comparisons made between HEV-1 and HEV-3 infected tissue, and (#) represents a statistical comparison between mock infected and HEV-1 or HEV-3 infected tissue. */# P<0.05; **/# P<0.01. (c,d) Correlation between IFN-λ1, or IFN-λ2/3 secretion and viral production in the

decidua (**c**) and placenta (**d**) two days after HEV-1 infection. Black and red points represent mock-, and HEV-1-infected tissues respectively. The Spearman's rank correlation test P value and R coefficient are indicated in each graph. (**e,f**) Kinetics of HEV virus production from explants established from the decidua (**e**) and placenta (**f**), infected with HEV-1. After infection, tissues were left untreated (CTRL, in red), treated with IFN- λ 1 (100 ng/mL, in black) or treated with IFN- λ 2 (100 ng/mL, in white). RNA levels were then measured in tissue culture supernatants by RT-qPCR. Data represent means values \pm S.E.M. of three independent donors. (*) denotes a statistical comparison between CTRL- and IFN- λ 2-treated infected tissues. (#) denotes a statistical comparison between CTRL- and IFN- λ 1-treated infected tissues. ***/### P<0.001 by repeated measures ANOVA with Tukey post-hoc test (**a,b**) and two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test (**e,f**).

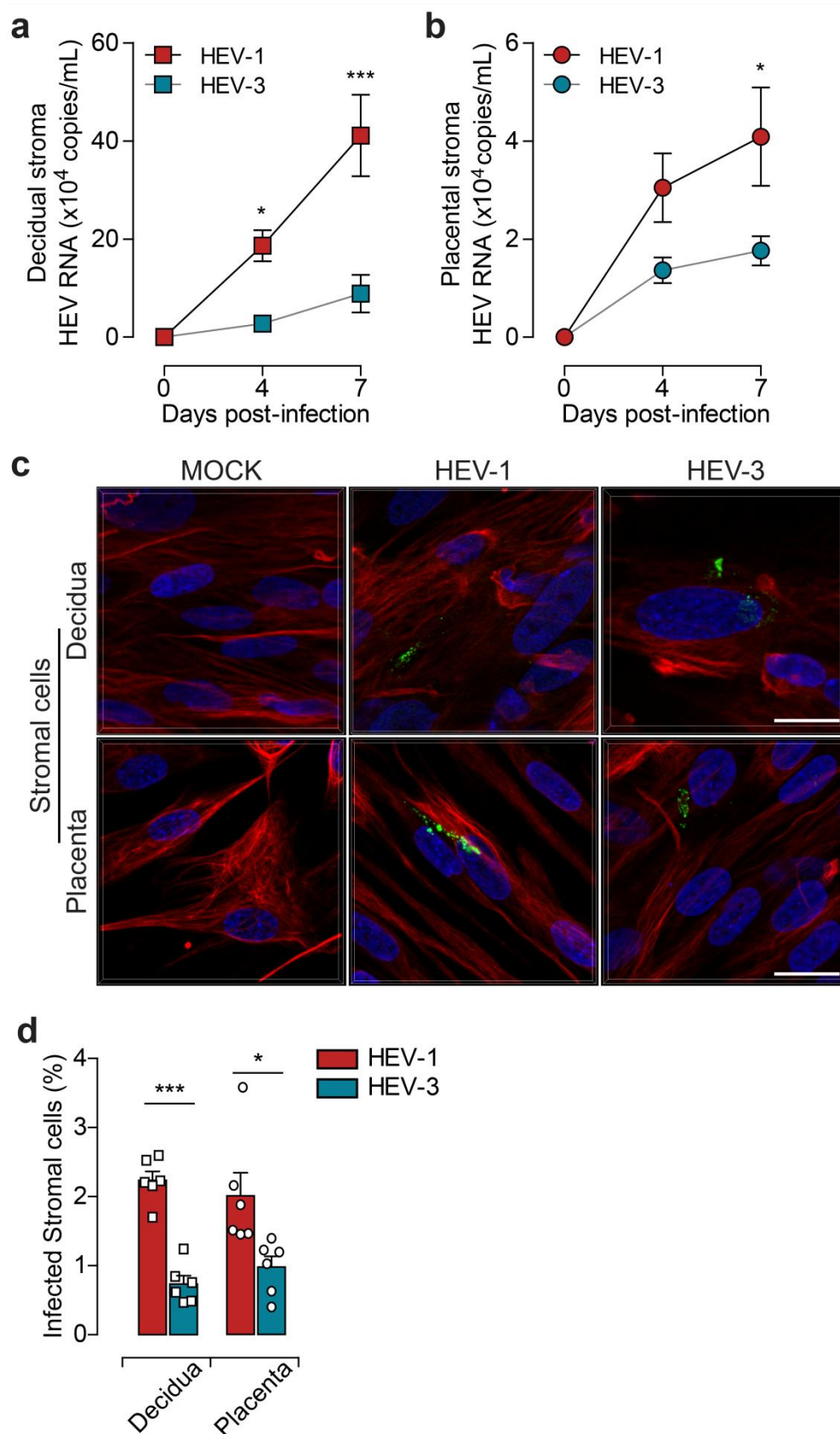


Figure 6. Primary decidual and placental stromal cells are targets of HEV-1 infection at the maternal-fetal interface. (a,b) Kinetics of viral RNA production in stromal cells derived

from the **(a)** decidua or **(b)** placenta, infected with either HEV-1 (red) or HEV-3 (cyan). Virus production was determined by RT-qPCR in culture supernatants. **(c)** Representative images of stromal cells derived from the decidua (upper panel) or placenta (lower panel), seven days after mock, HEV-1, or HEV-3 infection. 3D-reconstituted maximum intensity projections are shown, generated using the Imaris software. Staining indicates the ORF2 viral capsid protein (green), vimentin (red), and nuclei (blue). Scale bar, 20µm. **(d)** Bar graph illustrating the percentage of infected stromal cells derived from the decidua or placenta seven days after HEV-1 (red) or HEV-3 (cyan) infection and determined by ORF2 staining. Data represent mean values \pm S.E.M. of six independent donors. (*) denotes a statistical comparison made between HEV-1 and HEV-3 infected cells. * $P<0.05$; *** $P<0.001$ by two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test **(a,b)** and paired t-test **(d)**.

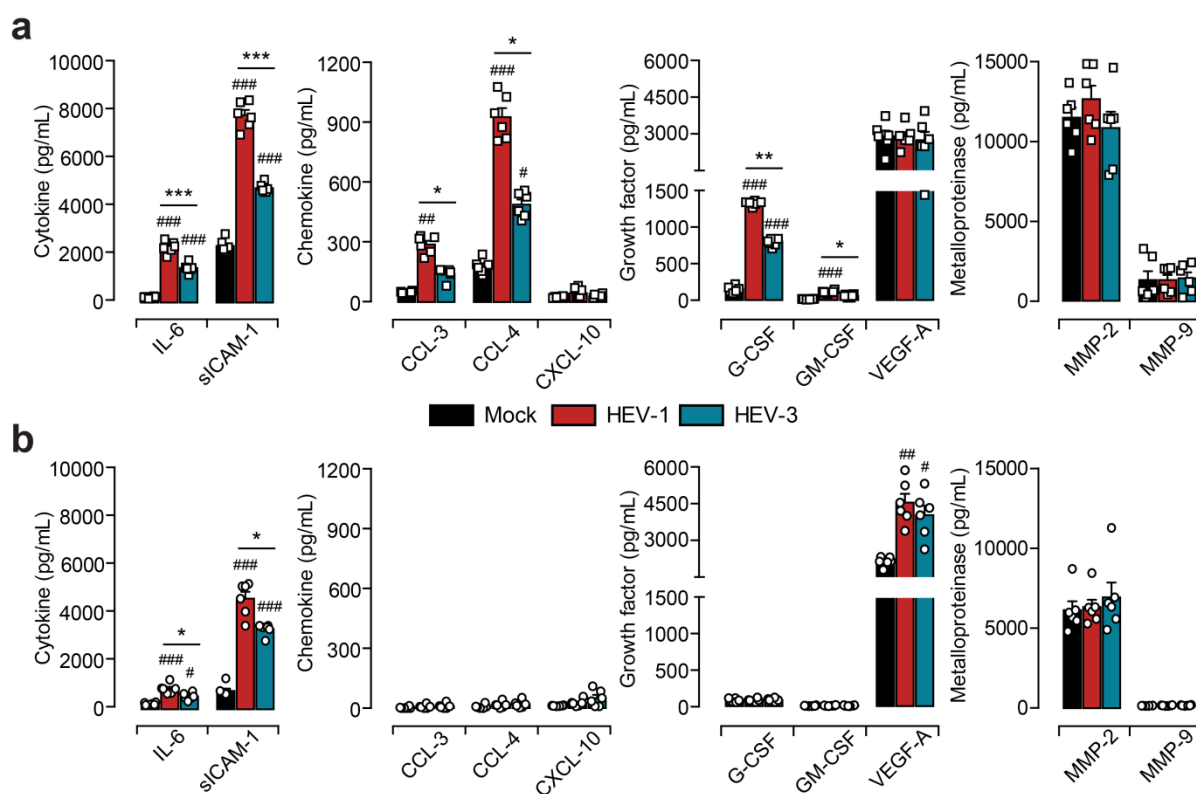


Figure 7. HEV-1 alters the secretory functions of both decidual and placental stromal cells. (a,b) Cytokine, chemokine, growth factor, and metalloproteinase secretion in decidual (a) and placental (b) stromal cell supernatants, measured by multiplex assay two days after mock (black), HEV-1 (red), or HEV-3 (cyan) infection. Data represent mean values \pm S.E.M. of six independent donors. (*) denotes a statistical comparisons made between HEV-1 and HEV-3 infected tissue, and (#) represents a statistical comparison between mock infected and HEV-1 or HEV-3 infected tissue. */# $P < 0.05$; **/# $P < 0.01$; ***/### $P < 0.001$ by repeated measures ANOVA with Tukey post-hoc test.

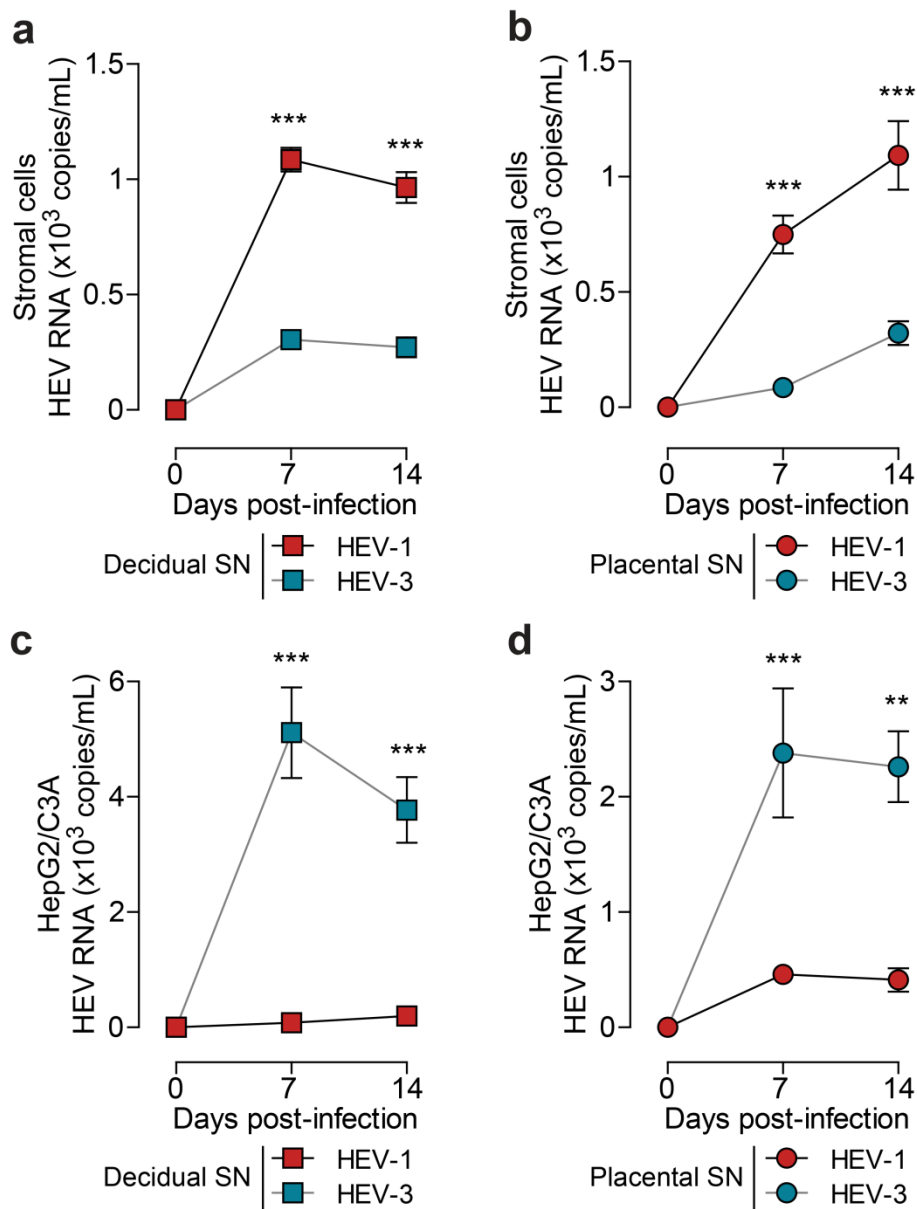


Figure 8. HEV-1 replication in explants derived from the decidua and placenta generates infectious progeny particles. Freshly isolated stromal cells (a,b), or the HepG2/C3A cell line (c,d), were challenged with culture supernatants (SN) from either HEV-1 (red), or HEV-3 (cyan) infected decidual (a,c), or placental (b,d) explants. Viral replication was then followed over a two-week period by RT-qPCR. Data represent means values \pm S.E.M. of six independent donors. (*) denotes a statistical comparison made between HEV-1 and HEV-3 infected cells. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ by two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test.

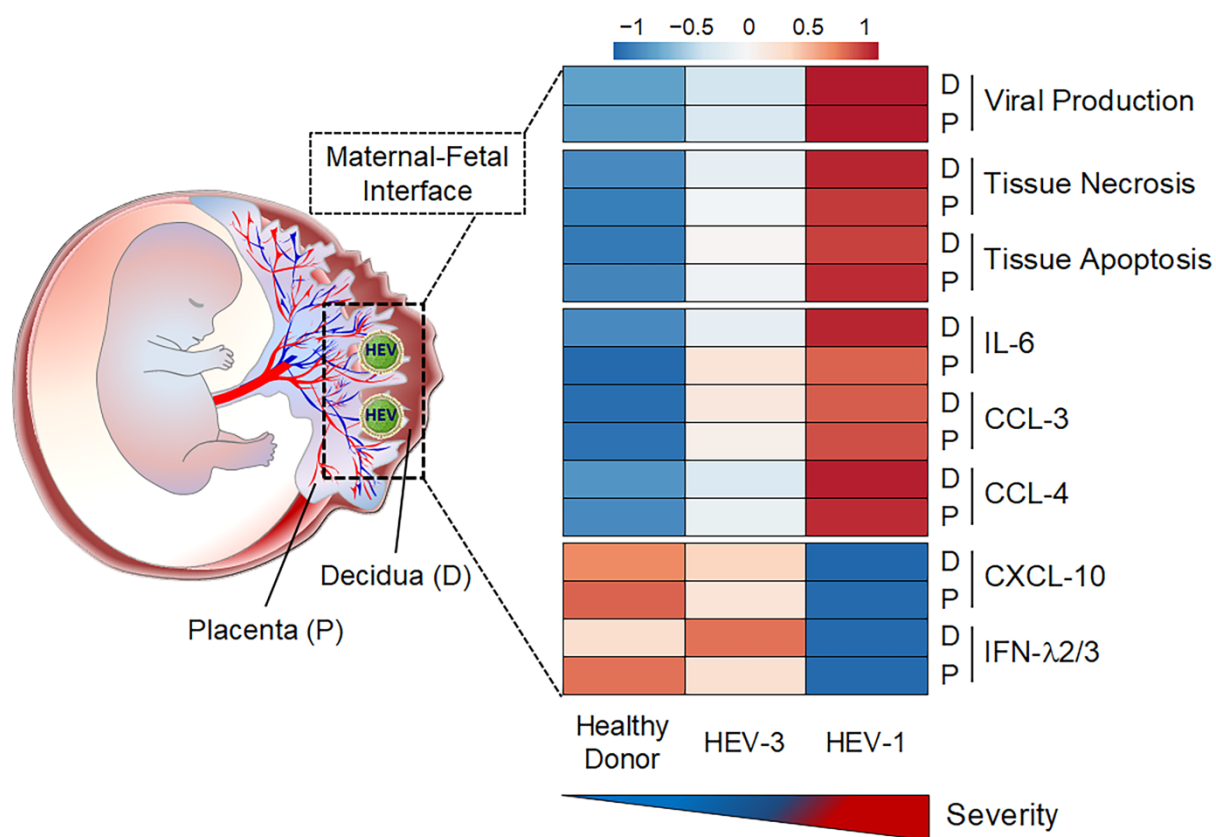
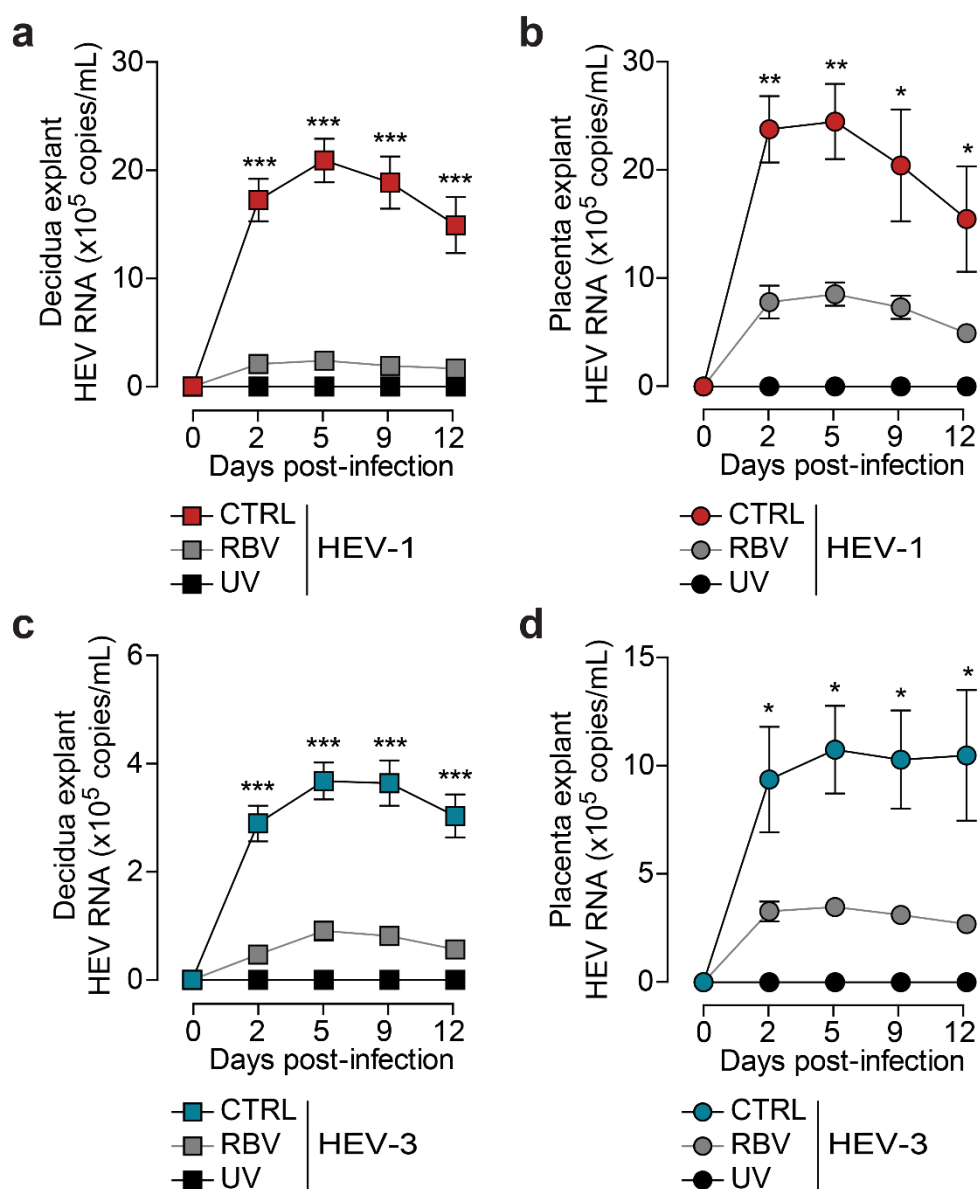
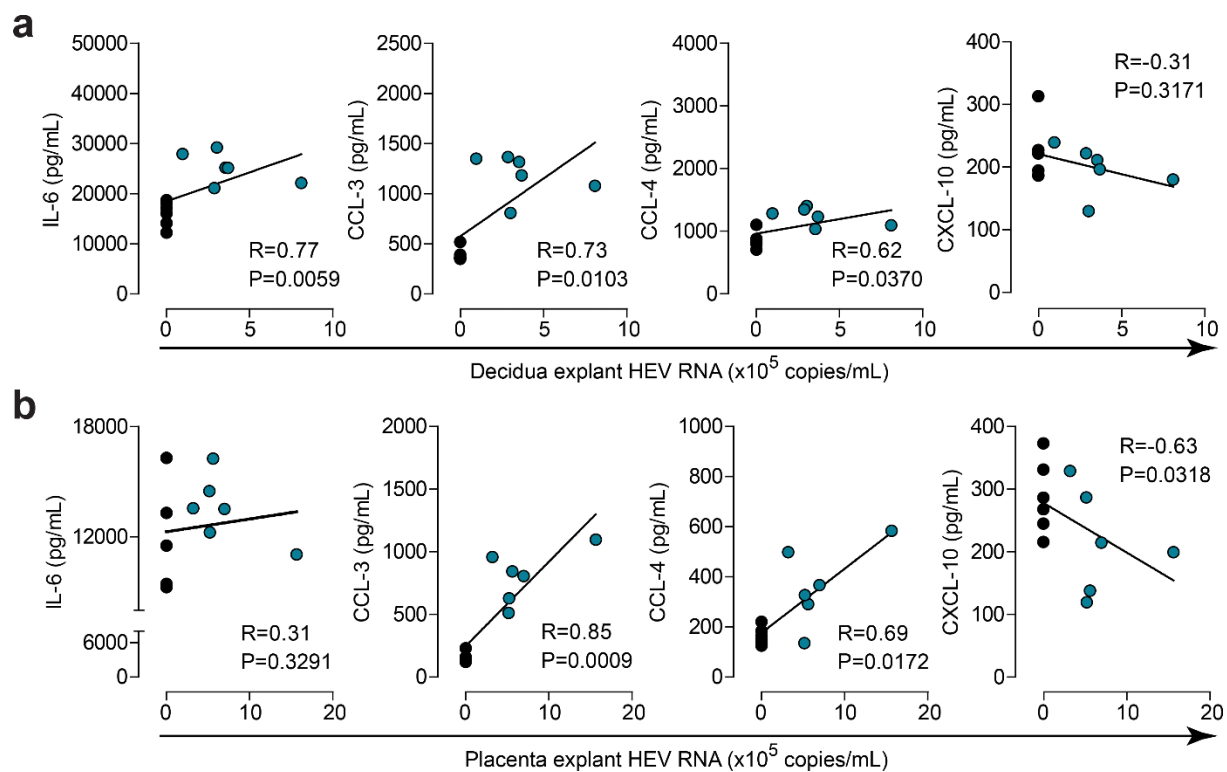


Figure 9. Genotype Specific Pathogenicity of Hepatitis E Virus at the Human Maternal-Fetal Interface. Graphical abstract summarizing the differences observed between HEV-1 and HEV-3 infection in the maternal *decidua basalis* (D) and fetal placenta (P). Heatmap was generated using mean values for the different parameters analyzed in each study group.

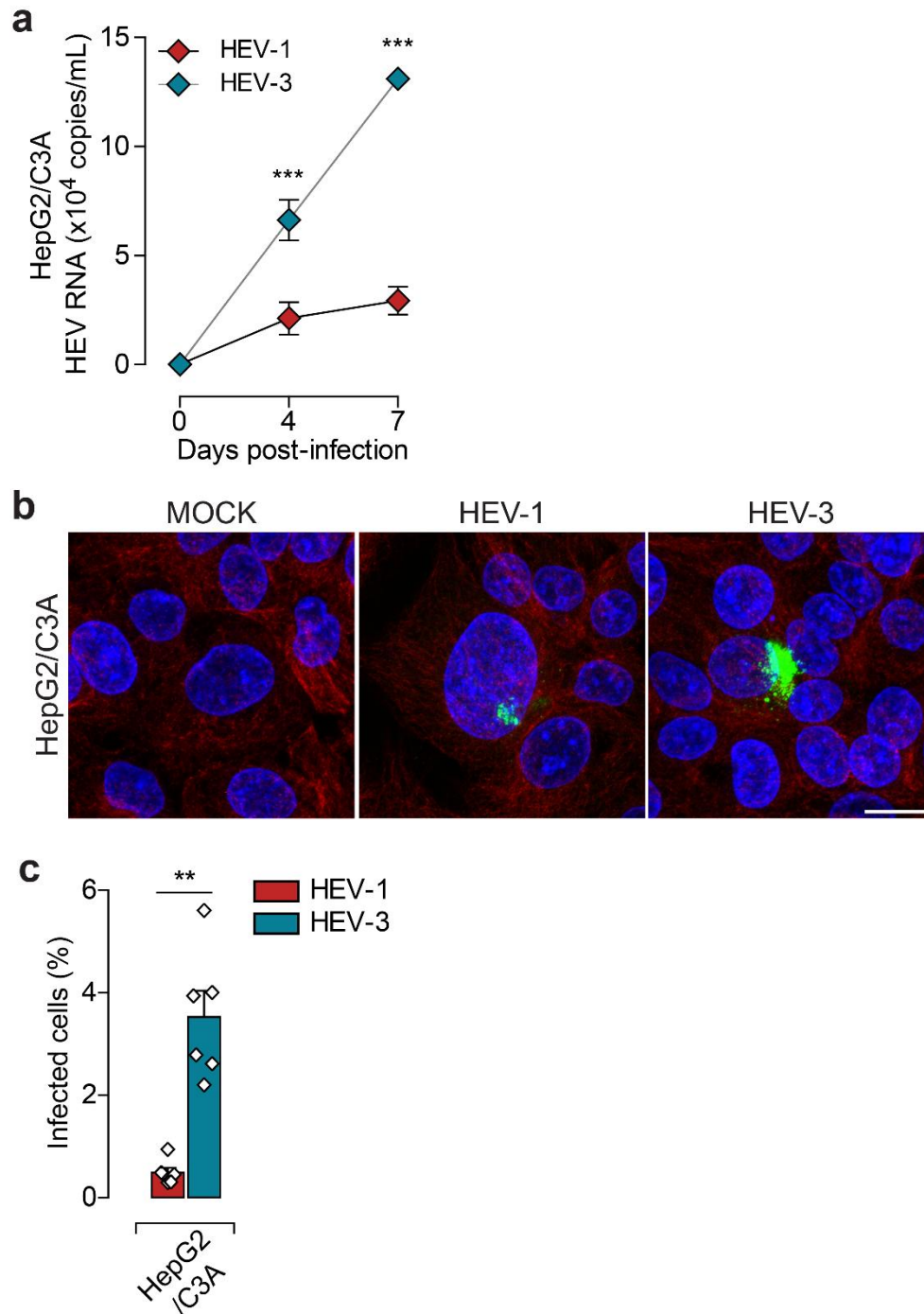
Supplementary information



Supplementary Figure 1. Ribavirin inhibits HEV-1 and HEV-3 replication in decidual and placental tissues. Kinetics of HEV virus production from explants established from the decidua (**a,c**) and placenta (**b,d**), infected with HEV-1 (**a,b**; in red), or HEV-3 (**c,d**; in cyan). After infection, tissues were left untreated (CTRL) or treated with 50μM of ribavirin (RBV, in grey). UV-irradiated virions failed to infect decidual and placental explants (UV, in black). RNA levels were then measured in tissue culture supernatants by RT-qPCR. Data represent means values \pm S.E.M. of three independent donors. (*) denotes a statistical comparison between CTRL- and RBV-treated infected tissues. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ by two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test.



Supplementary Figure 2. HEV-3 infection of decidual and placental tissues skews their secretory function. (a,b) Correlation between IL-6, CCL-3, CCL-4 or CXCL10 secretion and viral production in the decidua (a) and placenta (b) two days after HEV-3 infection. Black and cyan points represent mock-, and HEV-3-infected tissues respectively. The Spearman's rank correlation test P value and R coefficient are indicated in each graph. Data represent values of six independent donors.



Supplementary Figure 3. HepG2/C3A cells are targets of HEV-3 and, to a lower extent, HEV-1 infection. (a) Kinetic of viral RNA production in HepG2/C3A cell line, infected with either HEV-1 (in red) or HEV-3 (in cyan). Virus production was determined by RT-qPCR in culture supernatants. (b) Representative images of HepG2/C3A cells seven days after mock, HEV-1, or HEV-3 infection. Maximum intensity projections are shown. Staining indicates the ORF2 viral capsid protein (green), α-tubulin (red), and nuclei (blue). Scale bar, 20μm. (d) Bar graph illustrating the percentage of infected HepG2/C3A cells seven days after HEV-1 (red)

or HEV-3 (cyan) infection and determined by ORF2 staining. Data represent mean values \pm S.E.M. of three independent experiments. (*) denotes a statistical comparison made between HEV-1 and HEV-3 infected cells. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ by two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test (a) and paired t-test (c).

II. Infection par le virus Zika (ZIKV) durant le premier trimestre de grossesse : pathogenèse et réponse immune

A. Tropisme du ZIKV à l'interface mère-fœtus

Durant la seconde partie de ma thèse, nous nous sommes intéressés au virus Zika (ZIKV). Ce virus est responsable d'une pandémie en Amérique du Sud depuis 2015 qui a été associée à des pathologies placentaires et à des défauts du neuro-développement chez le fœtus et des pathologies placentaires chez la mère [925]. Ces défauts étaient d'autant plus graves quand la mère est infectée au premier trimestre de la grossesse. En mars 2016, la souche asiatique du ZIKV a été isolée au laboratoire de virologie du CHU de Toulouse à partir de don de sperme d'un voyageur infecté, et amplifiée au laboratoire.

Afin de comprendre les voies impliquées dans la transmission mère-fœtus du virus, nous avons dans un premier temps analysé le tropisme viral à l'interface materno-fœtale. Pour cela, nous avons infecté des explants tissulaires de décidua, de placenta et de cordon ombilical, et montré une infection productive par le ZIKV dans ces différents tissus. Cependant, même si le virus infecte l'ensemble des placentas analysés, la réplication virale n'est pas homogène et certains explants placentaires montrent une réplication virale moins importante que d'autres. Enfin, l'analyse de l'architecture tissulaire par histologie a montré que le ZIKV endommage sévèrement les tissus maternels et fœtaux.

En parallèle, nous avons isolé les différentes populations cellulaires de ces tissus et avons testé leur capacité à être infectées par le ZIKV. Nous avons ainsi pu observer que le ZIKV infecte et se réplique à des niveaux très importants dans les cellules stromales et les macrophages (dM) déciduaux, mais aussi dans les cellules de Hofbauer (macrophages placentaires) et les cellules souches mésenchymateuses du cordon ombilical. Enfin, le virus est également capable d'infecter les cellules stromales, et les différents types de trophoblastes présents dans le placenta (CTV, STB).

Ainsi nos résultats, associés à d'autres articles publiés durant la même période, ont permis de caractériser le large tropisme du ZIKV à l'interface mère-fœtus durant le premier trimestre de grossesse [113,968,969]. De plus, ils furent les premiers à montrer l'infection des dM et la forte réplication virale dans les cellules stromales déciduales (DSC). L'ensemble de ces travaux, dont je suis co-premier auteur, a été publié le 19 octobre 2016 dans *Scientific Reports* [967].

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

ZIKA virus reveals broad tissue and cell tropism during the first trimester of pregnancy

Received: 30 June 2016
Accepted: 27 September 2016
Published: 19 October 2016

Hicham El Costa^{1,2,*}, Jordi Gouilly^{1,*}, Jean-Michel Mansuy², Qian Chen¹, Claude Levy³,
Géraldine Cartron⁴, Francisco Veas⁵, Reem Al-Daccak⁶, Jacques Izopet^{1,2} &
Nabila Jabrane-Ferrat¹

The outbreak of the Zika Virus (ZIKV) and its association with fetal abnormalities have raised worldwide concern. However, the cellular tropism and the mechanisms of ZIKV transmission to the fetus during early pregnancy are still largely unknown. Therefore, we *ex vivo* modeled the ZIKV transmission at the maternal-fetal interface using organ culture from first trimester pregnancy samples. Here, we provide evidence that ZIKV strain circulating in Brazil infects and damages tissue architecture of the maternal *decidua basalis*, the fetal placenta and umbilical cord. We also show that ZIKV replicates differentially in a wide range of maternal and fetal cells, including decidual fibroblasts and macrophages, trophoblasts, Hofbauer cells as well as umbilical cord mesenchymal stem cells. The striking cellular tropism of ZIKV and its cytopathic-induced tissue injury during the first trimester of pregnancy could provide an explanation for the irreversible congenital damages.

The Zika virus (ZIKV) is a single strand positive sense RNA virus that belongs to the *Flaviviridae* family. ZIKV infection is mostly asymptomatic and can be associated in some cases with a self-limiting mild illness¹. However, the recent outbreak of ZIKV has been associated with major fetal abnormalities^{1,2}.

Murine models have demonstrated that ZIKV infection damages the central nervous system, slows fetal growth and leads to miscarriage^{3–5}. However, mouse pregnancy differs from human pregnancy in many ways. The human hemo-monochorial placentation is characterized by a unique fetal trophoblasts invasion into the maternal *decidua basalis* (decidua). Another hallmark is the establishment of immunoprivileged fetal-maternal interfaces where fetal tissues are in close contact with the maternal immune system. The two main interfaces are the decidua that serves as the anchoring point for the placenta and the intervillous space where maternal blood bathes the floating placental villi^{6,7}. Placental villi are covered by an outer multinuclear syncytiotrophoblast layer (STBs) and an inner mononuclear cytotrophoblast layer (CTBs). At the base of the anchoring villi, proliferative CTBs differentiate into extravillous trophoblasts (EVTs), invade the decidua and remodel uterine arteries to ensure a proper blood flow into the intervillous space^{6,7}. Thus, viral pathogens that infect the mother can reach the fetus either by hematogenous spread to the placenta or by cellular transfer from the maternal decidua to the anchoring placental villi. Bayer *et al.* have suggested that fetal trophoblasts from full-term pregnancy are resistant to ZIKV infection⁸ while Quicke *et al.* have found that fetal macrophages - Hofbauer cells (HBC) - and to a lesser extend trophoblasts are permissive to ZIKV⁹. Other studies have nonetheless suggested that ZIKV-induced microcephaly is more likely to occur during the first trimester of pregnancy^{10–12}. However, the *cellular tropism* and *virulence* remain, as of yet, unexplored.

The purpose of our study focuses on exploring viral cell tropism using first trimester samples to shed new light on ZIKV pathogenesis. By using an *ex vivo* organ culture model, we demonstrate herein that the maternal decidua, fetal placenta and umbilical cord are permissive to ZIKV infection. Furthermore, the virus targets foundational cell types such as macrophages, fibroblasts, trophoblasts as well as mesenchymal stem cells (MSC). In

¹CPTP, INSERM U1043, CNRS UMR5282, Université Toulouse III, 31024 Toulouse, France. ²Laboratoire de Virologie, IFB, CHU Toulouse, 31059 Toulouse, France. ³Service de Gynécologie-Obstétrique, Clinique Sarrus-Teinturiers, 31300 Toulouse, France. ⁴Service de Gynécologie-Obstétrique, CHU Toulouse, 31059 Toulouse, France. ⁵IRD, UMR-Ministère de la Défense, Faculté de Pharmacie, Université de Montpellier, 34094 Montpellier, France. ⁶INSERM UMRS976, Université Paris Diderot, Hôpital Saint-Louis, 75010 Paris, France. *These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to N.J.-F. (email: nabila.jabrane-ferrat@inserm.fr)

addition to understanding fundamental mechanisms of ZIKV pathogenesis and its maternal-fetal transmission, our findings pave the way for future strategies to prevent congenital ZIKV infections.

Results

Maternal decidua basalis supports active ZIKV replication. To provide insights into early critical events involved in ZIKV transmission, we first examined whether the maternal decidua is prone to infection using an *ex vivo* organ culture. Decidual explants were infected with 6.10^{10} copies/mL and viral replication was monitored over time in culture supernatants by qRT-PCR. As shown in Fig. 1a, viral RNA gradually increased over time with a cumulative production of 2×10^2 -fold increase two weeks post-infection (Fig. 1a). This viral replication resulted in infectious virions since conditioned media from infected explants were able to infect HIPEC cells, an extravillous trophoblast cell line (Supplementary Fig. S1). Histological analysis of ZIKV-infected samples five days post-infection displayed evident morphological alterations illustrated by the presence of vacuolar cytoplasm and karyorrhexis (Fig. 1b).

Decidual fibroblasts (dFibroblasts) play a critical role in viral replication and dissemination¹³. We therefore obtained primary dFibroblasts from the adherent cellular fraction of collagenase-digested tissue and infected them at a MOI of 1. ZIKV replication was followed by qRT-PCR in culture supernatant (Fig. 1c). The amounts of viral transcripts were markedly high reaching a plateau of 3×10^3 -fold increase within three days of infection. We next analyzed the expression of ZIKV envelope antigen (Fig. 1d). Immunostaining revealed a 20-fold increase in the number of infected dFibroblasts between days one and three post-infection with more than 40% of infected cells. The presence of viral foci and their increase in size over time suggest a cell-to-cell viral spread. Further analyses using confocal microscopy showed either localized perinuclear or diffuse cytoplasmic staining suggesting different stages of infection (Fig. 1e).

Decidual macrophages (dM ϕ) are targets for viral replication and share some features with dendritic cells including the expression of DC-SIGN, which is an entry receptor for ZIKV^{14,15}. To further identify the mode of viral spread within the decidua, we assessed the susceptibility of dM ϕ to ZIKV infection. Cells were isolated from collagenase-digested tissue by CD14 positive selection and infected at a MOI of 1. In contrast to dFibroblasts, we observed a gradual increase of ZIKV transcripts in dM ϕ over time with an overall 70-fold increase after eight days of infection (Fig. 1f). These findings were further strengthened by the presence of ZIKV envelope antigen in dM ϕ , expressing the classical lineage marker CD68 (Fig. 1g). More than 15% of dM ϕ were infected five days post-infection with a 3-fold increase of viral antigen expression between days three and five. Furthermore, viral envelope antigen were enclosed within vesicular structures as shown by fine confocal microscopy (Fig. 1h).

Taken together, the differential ZIKV replication in a variety of decidual cell types and its induced tissue injury may favor complications and/or viral dissemination to the fetal placenta during the first trimester of pregnancy.

ZIKV infection damages first trimester fetal placenta. Since placental villi are in close contact with the decidua, we assessed their susceptibility to ZIKV infection. To this end, placental explants were infected with ZIKV (6.10^{10} copies/mL) and viral replication was monitored in culture supernatants by qRT-PCR. Kinetic experiments demonstrated that ZIKV is able to infect placental explants (Fig. 2a). However, viral RNA production varied amongst donors. Some placenta displayed a 90-fold increase in viral production over thirteen days of culture whilst others maintained a constant level over time (Fig. 2a). Furthermore, histological analysis of the *ex vivo* mock- or ZIKV-infected organ cultures showed drastic alterations of the placental villi architecture with disruption of the trophoblastic layers (Fig. 2b, top micrograph). Signs of pathogenicity were also identified as major changes in nuclei morphology including karyorrhexis and karyolysis (Fig. 2b, bottom micrograph).

The major cellular component of placental villi are mesenchymal/fibroblast-like cells, trophoblasts and macrophages (HBC). Recent study reported that HBC and to lesser extend trophoblasts from term placenta are permissive to ZIKV⁹. We therefore digested the placental villi in order to define which cells are prone to ZIKV infection during the first trimester of pregnancy. Purified CD14 positive HBC and HBC-negative fraction containing the other placental cells were then infected separately at a MOI of 1. Microscopy analysis revealed that at least 10% of the HBC-negative fraction expressed the envelope antigen five days post-infection (Fig. 2c). Further analysis using confocal microscopy illustrated a perinuclear and a diffused cytoplasmic viral envelope staining within mesenchymal/fibroblast-like cells (Vimentin positive, Fig. 2d upper left micrograph), and in CTBs (CK positive and Vimentin negative, Fig. 2d lower left micrograph). Viral envelope was also found in multinucleated CTBs (Fig. 2d right micrograph) and in CTBs expressing the proliferation marker Ki67 (Supplementary Fig. S2) suggesting that STBs and EVT are also targets for infection. Viral replication kinetics in HBC supernatants displayed an 85-fold increase and reached a plateau three day post-infection (Fig. 2e). Conversely, localized distribution of ZIKV antigen was further observed in 5% of HBC suggesting that the amount of viral RNA does not reflect the percentage of infected cells (Fig. 2f,g).

Collectively, these findings demonstrate that ZIKV can infect the placenta in a donor-dependent manner and disrupt the fetal barrier during the first trimester of pregnancy. Furthermore, the infection of a wide range of cell types in the placental villi can be responsible for the virus spread to the fetus.

ZIKV replicates extensively in the first trimester umbilical cord. The fact that the first trimester placenta is susceptible to ZIKV infection, along with data showing the presence of the virus in the amniotic fluid¹⁶ prompted us to investigate whether the virus targets the umbilical cord. Therefore, umbilical cord (UC) rings from first trimester were infected with ZIKV (6.10^{10} copies/mL) and viral RNA was quantified in culture supernatant by qRT-PCR. Results reported in Fig. 3a show a gradual increase of viral genome replication with a cumulative 50-fold increase two weeks post-infection (Fig. 3a).

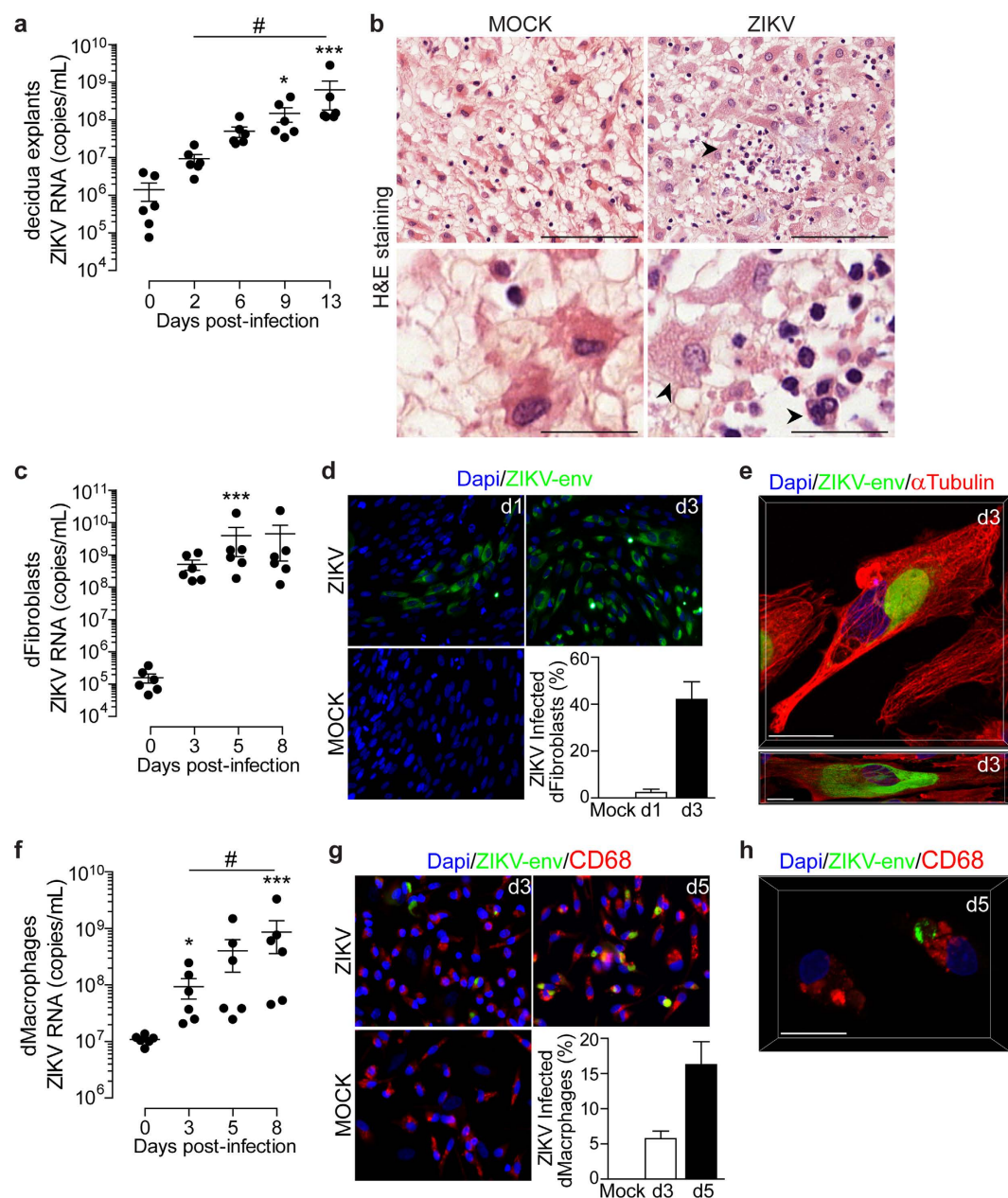


Figure 1. ZIKV replicates in first trimester decidua tissue and cells. (a) Decidua explants were infected with 6.10^{10} copies/mL of ZIKV. Viral titer was determined in culture supernatant by qRT-PCR. Data are represented as the mean of three biological replicates for each donor ($n = 6$). (b) Histopathological analysis of H&E-stained sections prepared from mock- and ZIKV-infected decidua organ. Arrowhead point to ZIKV-induced cytopathic effect (top). Scale bar, $100\mu\text{m}$. Enlarged micrograph shows vacuolar cytoplasm and nuclear changes illustrated by karyorrhexis (bottom, arrowheads). Scale bar, $25\mu\text{m}$. (c) Kinetic of ZIKV replication in decidual fibroblasts (dFibroblasts) as determined by qRT-PCR ($n = 6$). (d) Representative large field view of mock- or ZIKV-infected dFibroblasts (ZIKV-env) at day 1 (d1) and day 3 (d3) post-infection. Bar graph represents the mean values determined from ten fields of view for each donor ($n = 4$). (e) 3D reconstitution of confocal microscopy of ZIKV-infected dFibroblasts at d3. Two representative profiles of ZIKV envelope staining. Scale bar, $20\mu\text{m}$. (f) Kinetic of ZIKV replication in decidual macrophages (dMacrophages) as determined by qRT-PCR ($n = 6$). (g) Representative large field view of mock- or ZIKV-infected dMacrophages (ZIKV-env) at day 3 (d3) and day 5 (d5) post-infection. Bar graph represents the mean values determined from ten fields of view for each donor. ($n = 4$). (h) 3D reconstitution of confocal microscopy of ZIKV-infected dMacrophages at d5. Scale bar, $20\mu\text{m}$. Primary cells were infected with ZIKV at a MOI of 1. Mean \pm s.e.m. of n independent donors are represented. Friedman's test with Dunn's multiple comparison post-test was used. (*) represents statistical comparison between day 0 and other time points (#) represents statistical comparison between different time points. (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$).

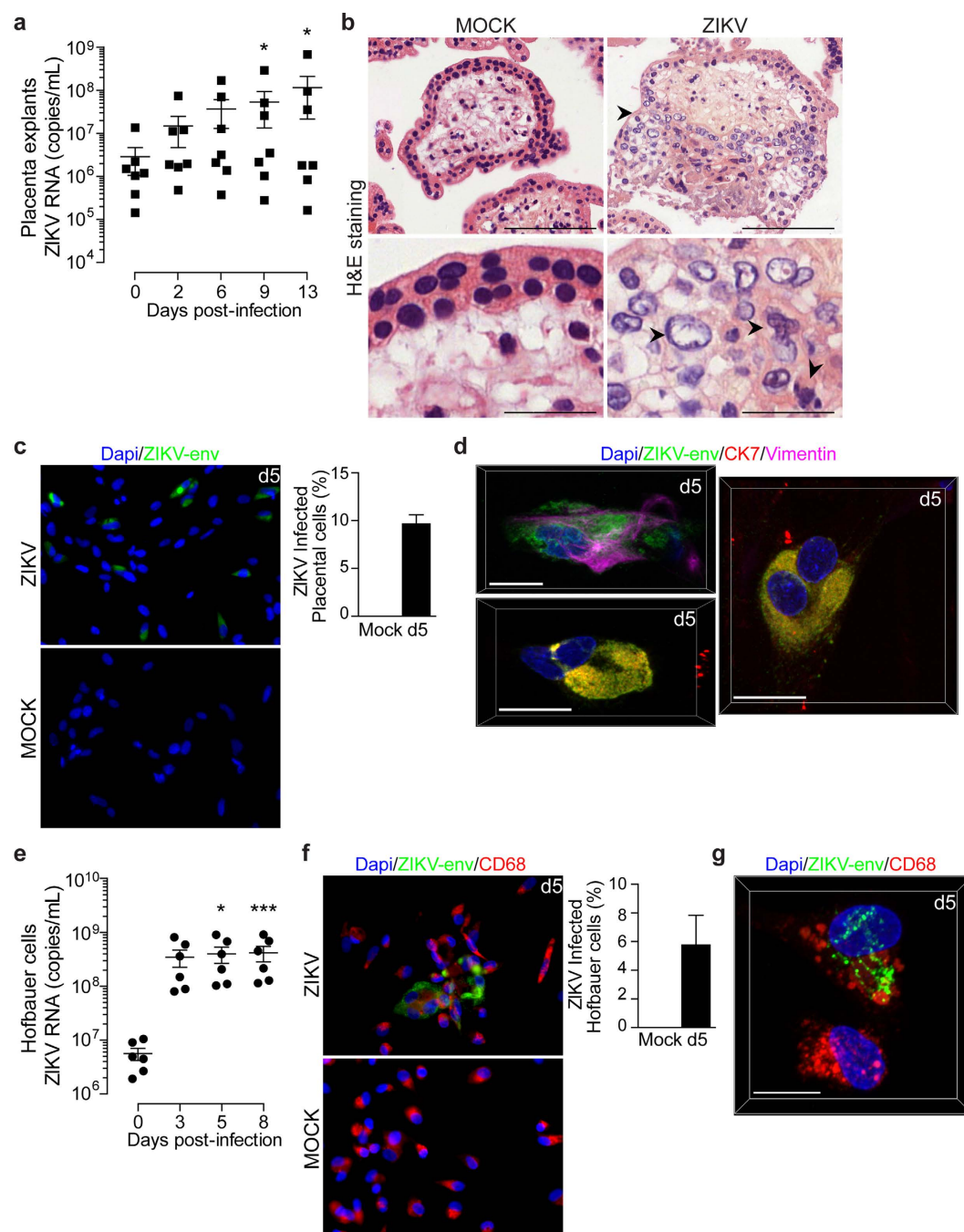


Figure 2. ZIKV replicates in first trimester placental cells and damages tissue architecture. (a) Placenta explants were infected with 6.10^{10} copies/mL of ZIKV. Viral titer was determined in culture supernatant by qRT-PCR. Data are represented as the mean of three biological replicates for each donor ($n = 7$). (b) Histopathological analysis of H&E-stained sections prepared from mock- and ZIKV-infected placental organ. Arrowhead point to gross alterations of tissue architecture with changes in trophoblast layers at the surface of the villi (Top). Scale bar, $100\ \mu\text{m}$. Enlarged micrograph shows nuclear changes illustrated by karyorrhexis and karyolysis (bottom, arrowheads). Scale bar, $25\ \mu\text{m}$. (c) Representative large field view of mock- or ZIKV-infected placental cells (ZIKV-env) at day 5 (d5) post-infection. Bar graph represents the mean values determined from ten fields of view for each donor ($n = 4$). (d) 3D reconstitution of confocal microscopy of ZIKV-infected mesenchymal/fibroblast-like cells (upper left micrograph), CTBs (lower left micrograph) and STBs (right micrograph) at d5. Scale bar, $20\ \mu\text{m}$. (e) Kinetic of ZIKV replication in Hofbauer cells as determined by qRT-PCR. ($n = 6$). (f) Representative large field view of mock- or ZIKV-infected Hofbauer cells (ZIKV-env) at day 5 (d5) post-infection. Bar graph represents the mean values determined from ten fields of view for each donor ($n = 4$). (g) 3D reconstitution of confocal microscopy of ZIKV-infected Hofbauer cells at d5. Scale bar, $20\ \mu\text{m}$. Primary cells were infected at a MOI of 1. Mean \pm s.e.m. of n independent donors are represented. Friedman's test with Dunn's multiple comparison post-test was used. (*) represents statistical comparison between day 0 and other time points (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

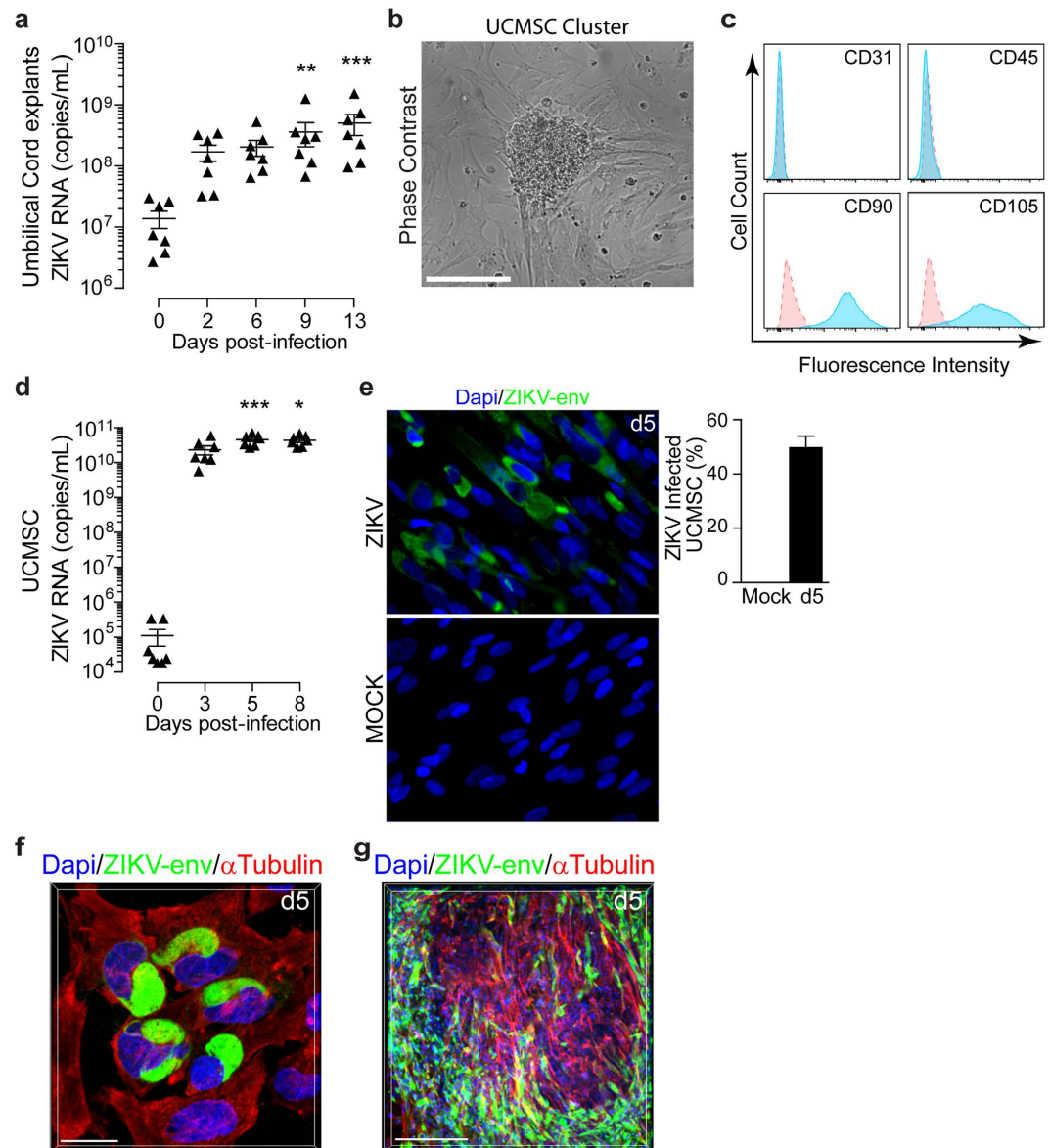


Figure 3. Umbilical cord and mesenchymal stem cells are prone to ZIKV infection. (a) Umbilical cord (UC) rings were infected with 6.10^{10} copies/mL ZIKV and viral titer was determined in culture supernatant by qRT-PCR. Data are represented as the mean of three biological replicates for each donor ($n = 7$). (b) Relief phase contrast image of cell cluster and rapidly expanding adherent spindle-shaped fibroblast-like cells compatible with undifferentiated mesenchymal stem cells (MSC) morphology. Scale bar, 200 μ m. (c) Representative flow cytometry histograms of UCMSC phenotype using CD31, CD45, CD90 and CD105 markers. Specific staining (blue) and control (red). (d) Kinetic of ZIKV replication in UCMSC as determined by qRT-PCR ($n = 7$). (e) Representative large field view of mock- or ZIKV-infected UCMSC (ZIKV-env) at day 5 (d5) post-infection. Bar graph represents the mean values determined from ten fields of view for each donor ($n = 4$). (f) 3D reconstitution of confocal microscopy of ZIKV-infected UCMSC at d5. Scale bar, 20 μ m. (g) 3D reconstitution of confocal microscopy of ZIKV-infected UCMSC-organized cluster at d5. Scale bar, 200 μ m. Primary cells were infected with ZIKV at a MOI of 1. Mean \pm s.e.m. of n independent donors are represented. Friedman's test with Dunn's multiple comparison post-test was used. (*) represents statistical comparison between day 0 and other time points (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

UC is acknowledged to be a rich source of mesenchymal stem cells (UCMSC). To determine if UCMSC are prone to ZIKV infection, cells were isolated as previously described¹⁷. After two weeks, UC cultures revealed a monolayer of spindle-shaped fibroblast-like cells as well as cell clusters compatible with undifferentiated UCMSC (Fig. 3b). Flow cytometry analysis showed that more than 95% of UCMSC lack the expression of the endothelial and hematopoietic cell markers, CD31 and CD45. Furthermore, they all express the CD90 and CD105 markers that are characteristic of Wharton's jelly MSC's (Fig. 3c).

Next, we infected UCMSC with ZIKV at a MOI of 1 and monitored ZIKV RNA replication over time in culture supernatants. Massive viral replication was observed with a cumulative production of more than a 2×10^5 -fold increase three days post-infection (Fig. 3d). Furthermore, 50% of UCMSC were infected and showed a strong perinuclear staining of the viral envelope antigen five days post-infection (Fig. 3e,f). Confocal microscopy also revealed the infection of the UCMSC within the cluster suggesting a cell-to-cell viral spread (Fig. 3g).

Taken together, these data clearly demonstrate that the umbilical cord is highly permissive to ZIKV infection. Moreover, the infection of stem cell progenitors may preclude their multilineage differentiation and may be associated with viral spread to the central nervous system as well as other organs consequently leading to fetus sequelae.

Discussion

In the wake of the devastating congenital ZIKV infection, we investigated the viral tissue and cell tropism during the first trimester of pregnancy to provide insights into the basis of ZIKV spread to the fetus.

We demonstrate that the maternal decidua, mainly the dFibroblasts and dMφ are cellular targets for ZIKV infection during the first trimester of pregnancy. These cells provide a favorable microenvironment for successful pregnancy and play a key role in vascular remodeling and tissue homeostasis^{7,18,19}. Thus, the productive ZIKV infection of these fundamental cells would not only favor viral dissemination but may also impair their tissue-support functions²⁰. This is further supported by our observation of ZIKV-induced decidua injury. We also found that ZIKV replication in decidual tissue results in infectious virions able to infect an extravillous trophoblast cell line. Collectively, our data suggest that the maternal *decidua basalis* in early pregnancy could serve as a replication platform for ZIKV enabling viral amplification before spread to the placenta through the invasive CTBs at the base of the anchoring villi.

The placental unit is vital for proper fetal development and constitutes an innate barrier to invading pathogens. Our experiment using first trimester placental explants show that ZIKV replication is associated with tissue architecture alteration and could lead to disruption of the placental barrier. This in turn will enable the virus to spread to the fetus. More importantly, some placenta display high viral replication profiles whilst others display low replication profiles. These observations further support the notion that congenital sequelae are not systematic²¹. It is possible that extensive viral replication could lead to placental pathology and fetal infection. Low viral replication on the other hand will result in a self-limiting infection that can be cleared by the local immune system. In fact, the resistance of full-term trophoblasts to ZIKV has been associated with a production of type III interferon⁸ or with the expression of several antiviral genes⁹. Further studies are necessary to define whether similar mechanisms are at play during the first trimester of pregnancy.

Confocal microscopy analyses revealed that ZIKV infects first trimester trophoblasts (CTBs, STBs and EVTs), mesenchymal/fibroblast-like cells and HBC. These cells play a crucial role in both implantation and placentation^{22,23}. Thus, ZIKV replication might not only hamper their function but also enable the virus to gain access to fetal cells leading to severe complications during pregnancy. Our findings are in agreement with published work showing that term CTBs and HBC are targets for ZIKV⁹. Nonetheless, Bayer *et al.* reported that ZIKV fails to infect syncytialized CTBs from late gestation⁸. Several factors including variability among donors (as describe above), pregnancy stage (early *versus* term) and viral strain may be responsible for these discrepancies. Concomitantly with our work, Tabata *et al.* reported that STBs enclosed ZIKV in small vesicles without an efficient replication. However, ZIKV was detected in CTBs underlying STB layer²⁴. Taken together, our work and others suggest that STBs may play a role in ZIKV transmission to villous core even in the absence of viral replication. Thus, viral dissemination route from uterine maternal blood to villous core through the STBs should not be neglected.

The umbilical cord and in particular UCMSC are highly permissive to ZIKV infection. Since trophoblasts are prone to infection, ZIKV might access to UC through fetal blood or amniotic fluid that bathes the UC. Given the fact that MSC can differentiate into different tissues (including the osteogenic, adipogenic and neuronal progenitors²⁵), the microcephaly and the neural sequelae observed in congenital ZIKV infections might be explained at least partially by an abnormal differentiation of infected stem/progenitor cells.

Finally, we observed two major profile of viral subcellular localization dependent on cell types. In dMφ and HBC, the virus was enclosed in cytoplasmic vacuolar-like structures while in the other primary cells the viral envelope was either diffused in the cytoplasm or around the nucleus. RNA viruses including Flaviviruses are known to involve several interaction between viral and host factors in order to build their own replication factories^{20,26}. Thus, the observed viral localization may be related to different organization of host cell compartments and/or cytoskeleton dynamics that are cell specific. Although we did not characterize the exact architecture of these structures, high viral replication dynamic was observed in cells showing perinuclear and diffused cytoplasmic staining. Whilst a much slower dynamic was seen in cells displaying compartmentalized vacuolar-like viral structures. These observation are in agreement with previous studies where cellular compartment localization were associated to viral replication dynamics²⁷. Furthermore, the abundance of host factors, cell cycle progression and cell specific metabolism may impact the efficiency of replication^{28,29}. Therefore, understanding how ZIKV replication subverts the cellular machinery in different permissive cells is critical to define optimal pharmacologic intervention and reach viral eradication.

In summary, our present work on first-term pregnancy, provide evidence that ZIKV targets a set of tissues critical for fetus development including the maternal decidua, the fetal placenta as well as the umbilical cord. Furthermore, we show that ZIKV replicates differentially in a wide range of maternal and fetal cells, including dFibroblasts, dMφ, trophoblasts and HBC suggesting that the virus can reach the fetus through a succession of adjacent target cells from the *decidua basalis* to the anchoring villi. Our findings provide groundwork for translational research initiatives and can be used to develop efficient strategies to prevent congenital ZIKV.

Methods

Ethics statement. All the patients included in the study have provided written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki guidelines. The study was approved by the Research Ethical Comity Haute-Garonne and Agence de Biomédecine (PFS08-022). All experiments were performed in accordance with the approved guidelines.

Preparation of organ cultures and cell purification. First-trimester pregnancy samples (7–12 weeks of pregnancy) were obtained from healthy women undergoing vaginal elective termination of pregnancy (a cohort of 26 donors with an age range 18–30 years) as previously described³⁰. Briefly, 0.3 cm² tissue explant pieces were prepared from decidua basalis and placenta. Umbilical cord was cut into 2 mm rings. Tissue explants can be maintained up to three weeks in DMEM:F12 (v:v) culture medium with 10% fetal bovine serum (FBS)¹⁵. Primary cell suspensions were isolated from minced tissues subjected to collagenase IV (Sigma-Aldrich, France) digestion for 45 min at 37 °C under gentle stirring followed by Ficoll-Hypaque density gradient (Amersham Biotech) separation³⁰. Decidual macrophages and Hofbauer cells were purified by CD14 positive selection kit according to the manufacturer procedure (Miltenyi Biotec, France). Cell purity was at least 90% as determined by CD14 and CD68 staining. Decidual fibroblasts were purified from the decidual adherent mononuclear cell fraction by successive rounds of mild trypsin treatment¹³. UCMSC were prepared as described elsewhere¹⁷. Briefly, UC was firstly cut into small segments and cultured in 60 cm² Petri dishes (Corning, USA). Fragments of UC were left undisturbed in culture and monitored for up to two weeks to allow identification of MSC in the dishes. UCMSC at the P1 passage were used in all experiments.

ZIKV isolation and propagation. The Zika virus used in this study was isolated in January 2016 from semen collected from an infected symptomatic French traveler returning from Brazil³¹. High titer stocks were obtained by passing the virus in *Cercopithecus aethiops*, the African green monkey kidney epithelial cell line (Vero). Vero cells were inoculated with seminal fluid for 2 h (1:10 dilution) in DPBS containing 2% BSA. The viral inoculum was removed and cells were cultured in DMEM medium supplemented with 10% FBS. Medium was changed 24 h post viral inoculation. Supernatant was collected from infected cells five days post-infection. Viral stocks were stored in single use aliquots at −80 °C for subsequent infections.

Ex vivo infection of tissue explants and primary cells. Tissue explants and primary cells were infected overnight with 6×10^{10} RNA copies/mL (equivalent to a MOI of 0.5) or at a MOI of 1 respectively in DMEM:F12 containing 10% FBS. After several washes in DPBS, tissue explants were cultured in FBS-medium. Decidual explants were cultured on collagen sponge gels as described previously¹⁵. All tissue explant's experiments were performed in triplicate for each donor.

Quantitative ZIKV RT-PCR. RNA was extracted from patient samples and culture supernatants using MagNA Pure 96 DNA and Viral RNA Small Volume kits[®] on a MagNA Pure 96TM instrument (Roche, France). ZIKV RNA was detected by amplification of an NS5 fragment (Real Star Zika virus RT-PCR kit 1.0, Altona Diagnostic GmbH, Germany) using a Light Cycler 480 instrument (Roche Molecular Systems). The limit of detection was 150 copies/mL. Both assays were performed according to the manufacturer's instructions. Internal standards were used to correct for potential variation in the amount of input material. Quantitative RT-PCR values were further normalized and are given as viral RNA copy numbers/mL. Viral stocks were titrated using plaque-forming assay. Kinetic of viral production was determined as RNA copy number per mL, calculated based on a standard curve.

Fluorescent microscopy. Infected cells were fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.3% Triton X-100 and stained with antibodies against Flavivirus group antigen (D1-4G2-4-15, 1:500 dilution, Merck-Millipore), the classical macrophage marker CD68 (1:100 dilution, Dako), the trophoblast marker Cytokeratin 7 (CK7, 1:100 dilution, Dako), the proliferation marker Ki67 (1:250 dilution, Vector), Vimentin (1:100 dilution, Cell Signaling) and the microtubule marker alpha-tubulin (1:500 dilution, Sigma). Antigen staining was visualized with Alexa Fluor-conjugated class specific secondary antibodies (1:500 dilution, Invitrogen). Nuclei were visualized with 4,6-diamidino-2-phenylindole (Dapi, 1:10,000 dilution, Sigma). Large field microscopy was performed with Leica DM4000B microscope (Leica, Solms, Germany). Confocal z-stacks were captured using LSM710 confocal microscope (Carl Zeiss, Germany). 10×, 20× or 63× oil objectives were used for all acquisitions. Images were processed using Imaris software (Bitplane AG, Switzerland). The quantification values were obtained by calculating the percentage of infected cells over total cells (1,500 cells were analyzed for each donor).

Histological analysis. Tissue organ cultures were either mock or ZIKV-infected for five days as described above. Tissues were fixed with 10% formalin, embedded in paraffin, and then sliced into 3 µm-thick sections. Thin sections were processed for histology and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Photographs were taken with a Leica DMR microscope (Leica Microsystems, Nanterre, France) at ×40 objective, using 3DHISTECH panoramic slide viewer (3DHISTECH Kft, Budapest, Hungary).

Flow cytometry. Mouse fluorochrome-conjugated anti-human monoclonal antibodies were used. Anti-CD31 (phycoerythrin, 1:50 dilution, BD Pharmingen), anti-CD90 (fluorescein isothiocyanate, 1:50 dilution, BD Pharmingen), anti-CD45 (Vio-blue, 1:50 dilution, Miltenyi), anti-CD105 (allophycocyanin, 1:50 dilution, BD Pharmingen).

Cells were extensively washed in PBS and immunostained at 4 °C using fluochrome-coupled monoclonal antibodies diluted in FACS buffer (PBS, 1% FBS). Analyses were performed on a BD LSR-FORTESSA cytometer. Data were further analyzed using FlowJo™ software 10.1.

Statistical Analysis. Statistical analyses were carried out with GraphPad™ Prism software version 5.0 f. Friedman test with Dunn's multiple comparison test was used. Lines represent the mean, and error bars indicate s.e.m. The figure legends show in parentheses the number of independent donors used in each experiment. p values < 0.05 were considered significant. (*) represents statistical comparison between day 0 and other time points (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001). (#) Represents statistical comparison between different time points (#p < 0.05).

References

- Petersen, L. R., Jamieson, D. J., Powers, A. M. & Honein, M. A. Zika Virus. *N Engl J Med* **374**, 1552–1563, doi: 10.1056/NEJMra1602113 (2016).
- Malakar, J. *et al.* Zika Virus Associated with Microcephaly. *N Engl J Med* **374**, 951–958, doi: 10.1056/NEJMoa1600651 (2016).
- Lazear, H. M. *et al.* A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis. *Cell Host Microbe* **19**, 720–730, doi: 10.1016/j.chom.2016.03.010 (2016).
- Miner, J. J. *et al.* Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. *Cell* **165**, 1081–1091, doi: 10.1016/j.cell.2016.05.008 (2016).
- Cugola, F. R. *et al.* The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature* **534**, 267–271, doi: 10.1038/nature18296 (2016).
- Smith, S. K. Angiogenesis and implantation. *Hum Reprod* **15** Suppl 6, 59–66 (2000).
- Jabrane-Ferrat, N. & Siewiera, J. The up side of decidual natural killer cells: new developments in immunology of pregnancy. *Immunology* **141**, 490–497, doi: 10.1111/imm.12218 (2014).
- Bayer, A. *et al.* Type III Interferons Produced by Human Placental Trophoblasts Confer Protection against Zika Virus Infection. *Cell Host Microbe* **19**, 705–712, doi: 10.1016/j.chom.2016.03.008 (2016).
- Quicke, K. M. *et al.* Zika Virus Infects Human Placental Macrophages. *Cell Host Microbe*, doi: 10.1016/j.chom.2016.05.015 (2016).
- Kleber de Oliveira, W. *et al.* Increase in Reported Prevalence of Microcephaly in Infants Born to Women Living in Areas with Confirmed Zika Virus Transmission During the First Trimester of Pregnancy - Brazil, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **65**, 242–247, doi: 10.15585/mmwr.mm6509e2 (2016).
- Reefhuis, J. *et al.* Projecting Month of Birth for At-Risk Infants after Zika Virus Disease Outbreaks. *Emerg Infect Dis* **22**, 828–832, doi: 10.3201/eid2205.160290 (2016).
- Brasil, P. *et al.* Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro - Preliminary Report. *N Engl J Med*, doi: 10.1056/NEJMoa1602412 (2016).
- Siewiera, J. *et al.* Human cytomegalovirus infection elicits new decidual natural killer cell effector functions. *PLoS Pathog* **9**, e1003257, doi: 10.1371/journal.ppat.1003257 (2013).
- Hamel, R. *et al.* Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J Virol* **89**, 8880–8896, doi: 10.1128/JVI.00354-15 (2015).
- El Costa, H. *et al.* The local environment orchestrates mucosal decidual macrophage differentiation and substantially inhibits HIV-1 replication. *Mucosal Immunol* **9**, 634–646, doi: 10.1038/mi.2015.87 (2016).
- Calvet, G. *et al.* Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect Dis*, doi: 10.1016/S1473-3099(16)00095-5 (2016).
- Marmotti, A. *et al.* Minced umbilical cord fragments as a source of cells for orthopaedic tissue engineering: an *in vitro* study. *Stem Cells Int* **2012**, 326813, doi: 10.1155/2012/326813 (2012).
- Lash, G. E. *et al.* Decidual macrophages: key regulators of vascular remodeling in human pregnancy. *J Leukoc Biol*, doi: 10.1189/jlb.1A0815-351R (2016).
- Kendall, R. T. & Feghali-Bostwick, C. A. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Front Pharmacol* **5**, 123, doi: 10.3389/fphar.2014.00123 (2014).
- Fernandez-Garcia, M. D., Mazzon, M., Jacobs, M. & Amara, A. Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. *Cell Host Microbe* **5**, 318–328, doi: 10.1016/j.chom.2009.04.001 (2009).
- Johansson, M. A., Mier, Y. T.-R. L., Reefhuis, J., Gilboa, S. M. & Hills, S. L. Zika and the Risk of Microcephaly. *N Engl J Med*, doi: 10.1056/NEJMp1605367 (2016).
- Lunghi, L., Ferretti, M. E., Medici, S., Biondi, C. & Vesce, F. Control of human trophoblast function. *Reprod Biol Endocrinol* **5**, 6, doi: 10.1186/1477-7827-5-6 (2007).
- Tang, Z., Abrahams, V. M., Mor, G. & Guller, S. Placental Hofbauer cells and complications of pregnancy. *Ann N Y Acad Sci* **1221**, 103–108, doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05932.x (2011).
- Tabata, T. *et al.* Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells, Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. *Cell Host Microbe* **20**, 155–166, doi: 10.1016/j.chom.2016.07.002 (2016).
- Kwon, A. *et al.* Tissue-specific Differentiation Potency of Mesenchymal Stromal Cells from Perinatal Tissues. *Sci Rep* **6**, 23544, doi: 10.1038/srep23544 (2016).
- Novoa, R. R. *et al.* Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. *Biol Cell* **97**, 147–172, doi: 10.1042/BC20040058 (2005).
- Binder, M. *et al.* Replication vesicles are load- and choke-points in the hepatitis C virus lifecycle. *PLoS Pathog* **9**, e1003561, doi: 10.1371/journal.ppat.1003561 (2013).
- Sanchez, E. L. & Lagunoff, M. Viral activation of cellular metabolism. *Virology* **479–480**, 609–618, doi: 10.1016/j.virol.2015.02.038 (2015).
- Schang, L. M. The cell cycle, cyclin-dependent kinases, and viral infections: new horizons and unexpected connections. *Prog Cell Cycle Res* **5**, 103–124 (2003).
- El Costa, H. *et al.* Critical and differential roles of NKp46- and NKp30-activating receptors expressed by uterine NK cells in early pregnancy. *J Immunol* **181**, 3009–3017 (2008).
- Mansuy, J. M. *et al.* Zika virus: high infectious viral load in semen, a new sexually transmitted pathogen? *Lancet Infect Dis* **16**, 405, doi: 10.1016/S1473-3099(16)00138-9 (2016).

Acknowledgements

The authors thank E. Bahraoui, N. Espagnolle, J. Aziza and T. Al Saati for critical discussions. We also thank MDs from Paule de Viguier and Sarrus-Teinturiers hospitals for participating in the study, V. Calmes for ensuring the collection of clinical material. We are grateful for help from the CPTP (Cell Imaging and Flow Cytometry) and UMS-US006 (Histopathology) core facilities. English language proofreading was performed by D. McCarthy (English@Work). The work was supported by the INSERM and CNRS (N.J.-F., J.I.), ANRS (J.I., J.G.) and the “Chinese Scholarship Council” (Q.C.).

Author Contributions

H.E.C. and J.G. designed, conducted the research experiments and analyzed the data. Q.C. performed experiments. G.C. and C.L. provided clinical material for the study. J.-M.M. provided clinical material and performed experiments. J.I., J.-M.M., F.V. and R.A.-D. provided critical feedback and revised the manuscript. N.J.-F. designed and supervised the work. H.E.C. and N.J.-F. wrote and revised the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: El Costa, H. *et al.* ZIKA virus reveals broad tissue and cell tropism during the first trimester of pregnancy. *Sci. Rep.* **6**, 35296; doi: 10.1038/srep35296 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2016

ZIKA virus reveals broad tissue and cell tropism during the first trimester of pregnancy

**Hicham El Costa^{1,2,7}, Jordi Gouilly^{1,7}, Jean-Michel Mansuy², Qian Chen¹, Claude Levy³,
Géraldine Cartron⁴, Francisco Veas⁵, Reem Al-Daccak⁶, Jacques Izopet^{1,2} and Nabila
Jabrane-Ferrat^{1,*}**

¹*CPTP, INSERM U1043, CNRS UMR5282, Université Toulouse III, 31024 Toulouse, France.*

²*Laboratoire de Virologie, IFB, CHU Toulouse, 31059 Toulouse, France.*

³*Service de Gynécologie-Obstétrique, Clinique Sarrus-Teinturiers, 31300 Toulouse, France.*

⁴*Service de Gynécologie-Obstétrique, CHU Toulouse, 31059 Toulouse, France.*

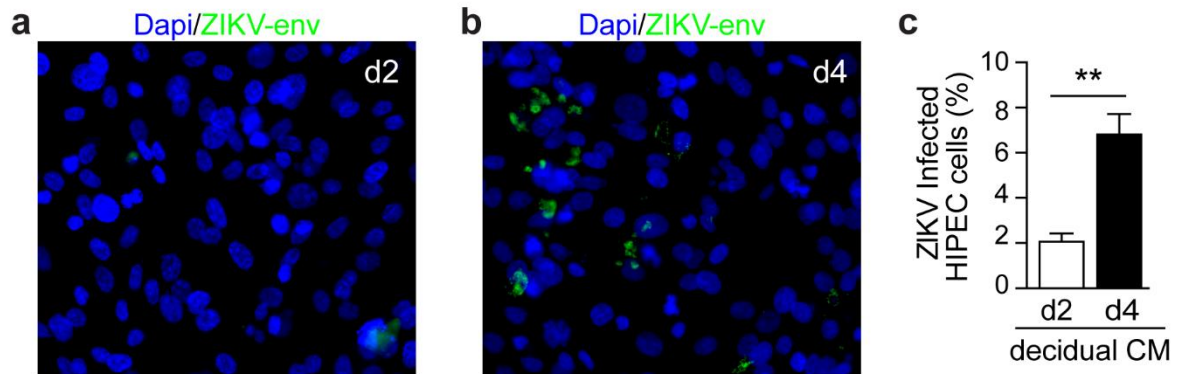
⁵*IRD, UMR-Ministère de la Défense, Faculté de Pharmacie, Université de Montpellier, 34094
Montpellier, France.*

⁶*INSERM UMRS976, Université Paris Diderot, Hôpital Saint-Louis, 75010 Paris, France.*

⁷*Co-first author*

* Corresponding author: Nabila Jabrane-Ferrat, PhD

E-mail:nabila.jabrane-ferrat@inserm.fr



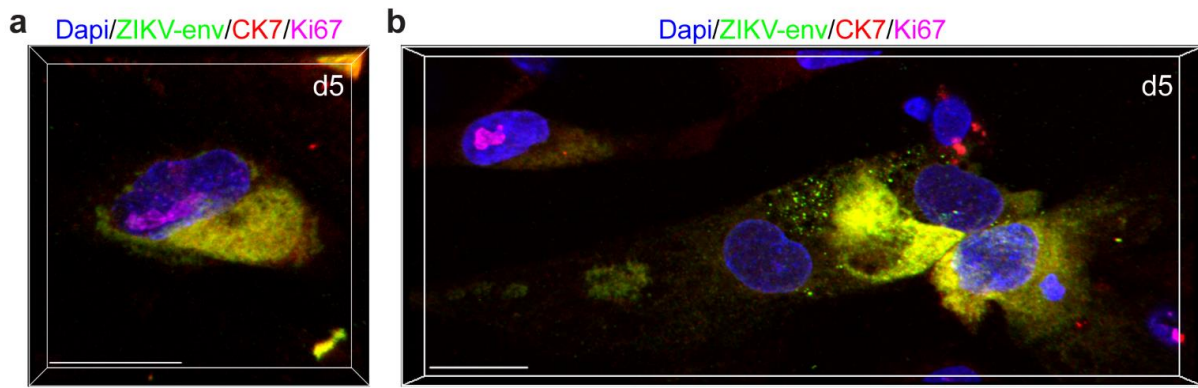
Supplementary Figure S1. Viral replication in *decidua basalis* explants produce infectious virions

HIPEC, an extravillous trophoblast cell line, was incubated with day 2 (d2) and day 4 (d4) conditioned media (CM) from infected decidual explants. The presence of infectious virions was monitored by immunostaining of the viral envelope after three days of culture.

(a) Representative large field view of ZIKV-infected HIPEC cultured in CM from d2.

(b) Representative large field view of ZIKV-infected HIPEC cultured in CM from d4.

(c) Bar graph represents the mean \pm s.e.m values determined from ten fields of view from six independent experiments. ** $p=0.0025$ using Mann-Whitney test.



Supplementary Figure S2. ZIKV replicates in EVTs, CTBs and STBs

Placental cells were infected with ZIKV at a MOI of 1.

(a) 3D reconstitution of confocal microscopy of proliferating ZIKV-infected EVT at day 5 post-infection (d5). Scale bar, 20µm.

(b) 3D reconstitution of confocal microscopy of ZIKV-infected EVTs, CTBs and STBs at d5. Scale bar, 20µm.

B. Impact de l'infection par le ZIKV sur le secrétome placentaire

Après avoir défini le tropisme du ZIKV à l'interface materno-fœtale, nous avons poursuivi nos travaux visant à caractériser la pathogenèse de l'infection. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux explants placentaires dans laquelle s'opposaient deux profils d'infection. En effet, le ZIKV se répliquait très fortement dans certains explants (ZIKV^H) alors qu'il se maintenait ou se répliquait faiblement dans d'autres (ZIKV^L). Ces deux profils d'infection pourraient expliquer l'association de l'infection à des conséquences différentes et/ou des pathologies distinctes. De plus, peu de données existaient sur les conséquences de l'infection par le ZIKV sur les fonctions placentaires.

Parmi ces différentes fonctions, nous avons choisi de nous intéresser dans un premier temps à la fonction sécrétrice du placenta. Nos données précédentes sur l'analyse histologique des placentas ont montré que le ZIKV endommage le tissu et perturbe l'architecture des villosités choriales. Ces dommages tissulaires pourraient causer une inflammation locale qui aurait des conséquences désastreuses lors de la grossesse. En parallèle, les nombreuses pathologies observées lors de l'infection congénitale (pré-éclampsie, RCIU, ...) suggèrent que le ZIKV pourrait être responsable d'un développement placentaire anormal.

Pour répondre à ces questions, nous avons utilisé une cohorte de 20 explants placentaires issus de 7 donneuses indépendantes. Les explants infectés par le ZIKV ont été comparés à des explants non infectés provenant du même placenta. Après avoir lavé les tissus infectés (ZIKV) ou non (CTRL), nous les avons remis en culture pendant deux jours et avons collecté les surnageants de culture. Une partie de ces surnageants nous a servi à vérifier le niveau d'infection des tissus (**Figure 53 A**) alors que nous avons utilisé le reste des surnageants pour tester la présence d'un large panel de facteurs solubles par Luminex (**Figure 53 B-G**) ou par CBA (**Figure 53 H**). Nous avons alors observé que l'infection par le ZIKV était responsable d'une modification significative de la production de 12 analytes. Ainsi, l'infection par le ZIKV diminue la production de chimiokines (CCL-3, CCL-4, CXCL-1, CXCL-10, CXCL-12), de facteurs de croissance (M-CSF, G-CSF, GM-CSF, VEGF-A) mais aussi de MMP-9 dans les explants placentaires. Au contraire, il augmente la sécrétion de CXCL-8 et de FGF-2. En revanche, l'analyse globale des explants placentaires n'a révélée aucune modification de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et des IFN. Enfin, d'autres facteurs solubles n'étaient pas détectables ou trop proches de la limite de détection dans les surnageants de culture pour être analysés (TNF- α , GzmB, IL-10, IL-18 et IL-33).

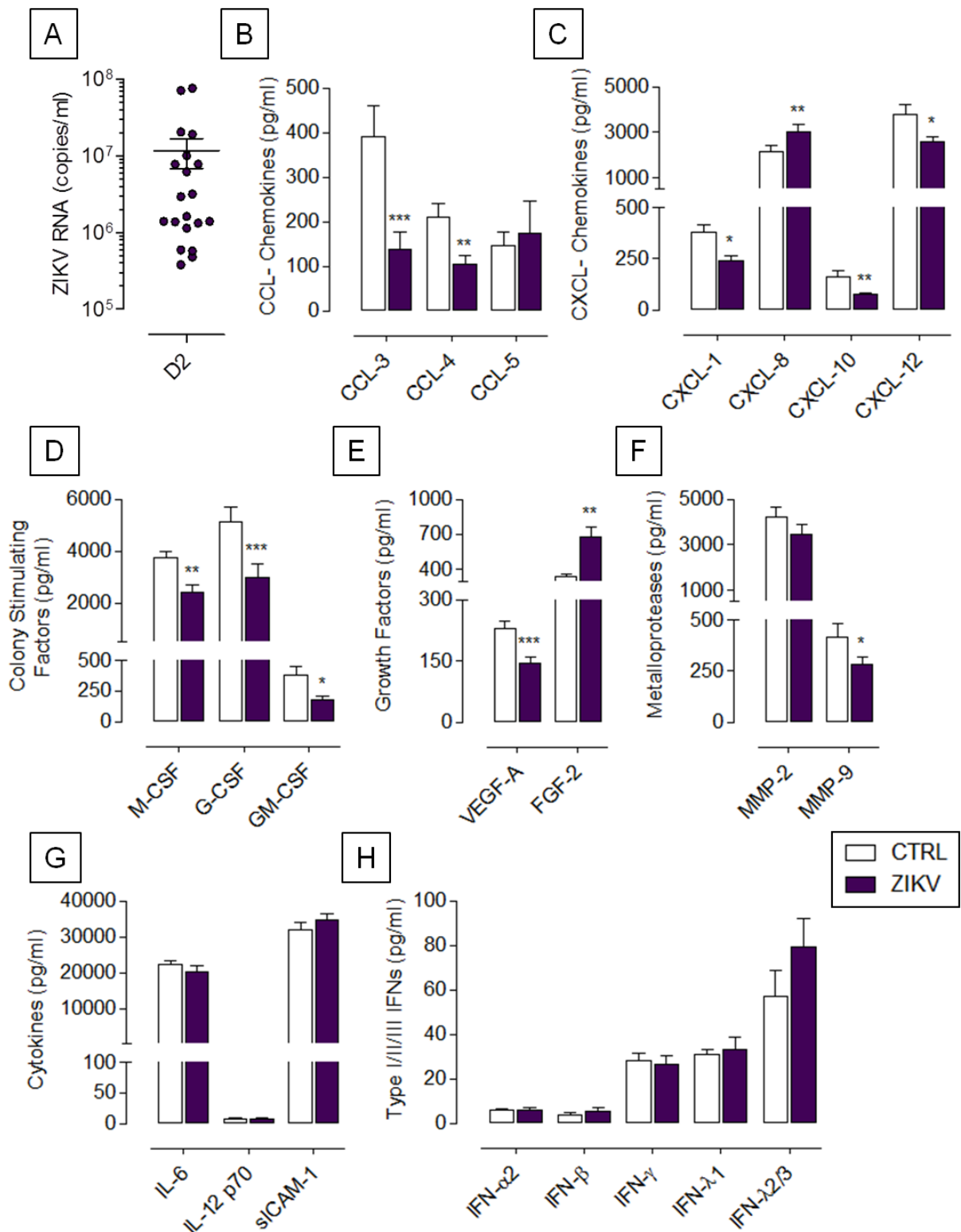


Figure 53 : Conséquences de l'infection par le ZIKV sur le sécrétome placentaire. 20 explants placentaires provenant de 7 donneurs indépendants ont été infectés par le ZIKV à une MOI de 1. Des explants provenant des mêmes donneuses mais non infectés ont été utilisés comme contrôle (CTRL). Après l'infection, les explants ont été lavés et remis en

culture pendant deux jours. Les surnageants de culture ont ensuite été prélevés et conservés à -80°C avant d'être analysés.

(A) Quantification de l'ARN ZIKV dans les surnageants de culture, mesurée par qRT-PCR.

(B-G) Quantification par Luminex de la production de chimiokines de type CCL- **(B)**, de type CXCL- **(C)**, de facteurs de stimulation de colonies **(D)**, de facteurs de croissance **(E)**, de MMP **(F)** et de cytokines **(G)** par les explants placentaires infectés (ZIKV, en violet) ou non (CTRL, en blanc).

(H) Quantification par CBA de la production d'IFN de type I, II et III par les explants placentaires infectés (ZIKV, en violet) ou non (CTRL, en blanc). Les graphes indiquent la valeur moyenne et les barres d'erreurs représentent la SEM ; t-test non-apparié ; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Nous avons ensuite séparé les explants placentaires en deux groupes en nous basant sur leur niveau de production virale. Nous avons refait la même analyse que précédemment en comparant les explants ayant une forte production virale (ZIKV^H) et ceux ayant une production virale plus faible (ZIKV^L) **(Figure 54 A)**. Nous avons alors observé que pour tous les analytes sauf six, la production de facteurs solubles est similaire entre les explants ZIKV^H et ZIKV^L. En revanche, les explants placentaires ZIKV^H produisent significativement plus d'IL-12 p70, IFN- γ , sICAM-1 et sFasL **(Figure 54 B)**. Au contraire, les explants ZIKV^L ont une production accrue de CXCL-8 et d'IFN- λ 2/3 **(Figure 54-C)**. Ainsi, en prenant en compte le niveau d'infection des explants placentaires, nous avons découvert une modification différentielle de la sécrétion de plusieurs facteurs solubles. Cette modification différentielle du sécrétome placentaire par l'infection n'était pas significative dans l'analyse globale (CTRL vs ZIKV). En conclusion, l'ensemble de ces résultats nous donne de nombreux indices sur la manière dont le ZIKV pourrait contribuer au développement de pathologies placentaires. Ces mécanismes potentiels et l'interprétation des données seront détaillés dans la partie Discussion.

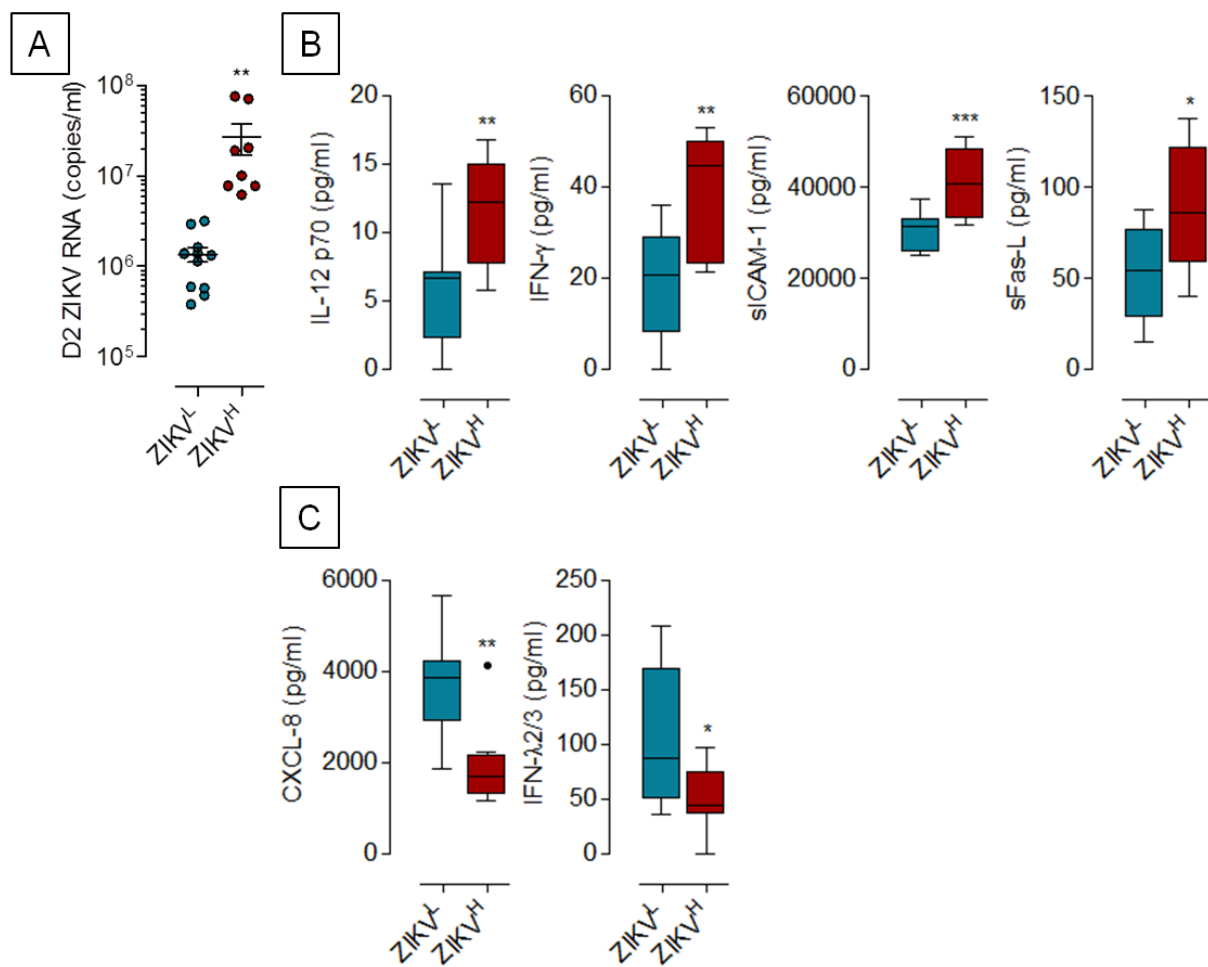


Figure 54 : Facteurs solubles qui discriminent les explants ZIKV^H des ZIKV^L. Les explants placentaires infectés par ZIKV ont été séparés sur la base de leur forte (ZIKV^H, en rouge) ou faible (ZIKV^L, en cyan) production virale.

(A) Répartition des explants selon leur production virale.

(B-C) Quantification des facteurs solubles différenciellement produits par les explants ZIKV^H et ZIKV^L. Certains des facteurs sont majoritairement produits par les explants ZIKV^H **(B)** alors que d'autres sont majoritairement produits par les explants ZIKV^L **(C)**. Les autres facteurs solubles présentés dans la Figure 53 ne diffèrent pas entre les groupes. Les valeurs sont représentées avec des boîtes à moustache de Tukey ; t-test non-apparié ; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

C. Contrôle de l'infection déciduale du ZIKV par les cellules dNK

Après avoir défini le tropisme du ZIKV et les conséquences de l'infection sur le sécrétome placentaire, nous nous sommes intéressés au rôle du système immunitaire de la *decidua basalis* dans le contrôle de l'infection. En effet, nos études avaient permis de prouver que les cellules stromales déciduales (DSC) et les macrophages déciduaux (dM) étaient des cibles cellulaires du ZIKV et permettaient une réplication efficace de son génome [967]. Cependant, ces résultats étaient paradoxaux car *in vivo* la transmission du ZIKV au fœtus n'est pas systématique. Ainsi, d'autres mécanismes doivent être mis en place au niveau de l'interface mère-fœtus afin de limiter l'infection. Le premier trimestre de grossesse étant caractérisé par la présence d'un nombre élevé de cellules dNK (30% des cellules déciduales totales), ces cellules constituent un candidat idéal pour expliquer le contrôle de l'infection.

Nous avons émis l'hypothèse que les cellules dNK pourraient contrôler l'infection de la décidua par le ZIKV, ce qui limiterait la transmission au fœtus. Au contraire, dans des cas où la réponse dNK ne serait pas optimale ou retardée, le virus pourrait se répliquer massivement dans la décidua avant de se transmettre au fœtus. Afin de tester cette hypothèse, nous avons analysé la capacité des cellules dNK autologues à limiter l'infection des DSC provenant de la même donneuse. En parallèle à cette étude, nous avons analysé la capacité des cellules NK du sang périphérique (pNK) à limiter l'infection. Pour des raisons techniques nous avons utilisé des cellules pNK hétérologues provenant de donneurs sains de l'EFS (buffy coat).

Au moment où nous avons initié ce projet, seule une étude s'était intéressée au rôle des cellules pNK durant l'infection par ZIKV [1000]. Elle avait montré, en utilisant une lignée de cellules épithéliales, que les cellules infectées augmentaient leur expression de molécules de CMH-I. Ainsi, cette expression accrue de CMH-I permettrait l'engagement des récepteurs inhibiteurs à la surface des cellules pNK, ce qui empêcherait le déclenchement de leurs fonctions effectrices. Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier si ce mécanisme était applicable dans notre système. Pour ce faire, nous avons infecté des DSC par le ZIKV et avons analysé l'expression de molécules de CMH-I classiques (HLA-A/B/C) et non classiques (HLA-E) au cours du temps (**Figure 55**). Nous avons alors observé une augmentation progressive de l'expression des molécules de CMH-I à la surface des DSC, qui est maximale au jour 5 post-infection. Au contraire, le niveau de CMH-I reste constant sur les DSC non infectées.

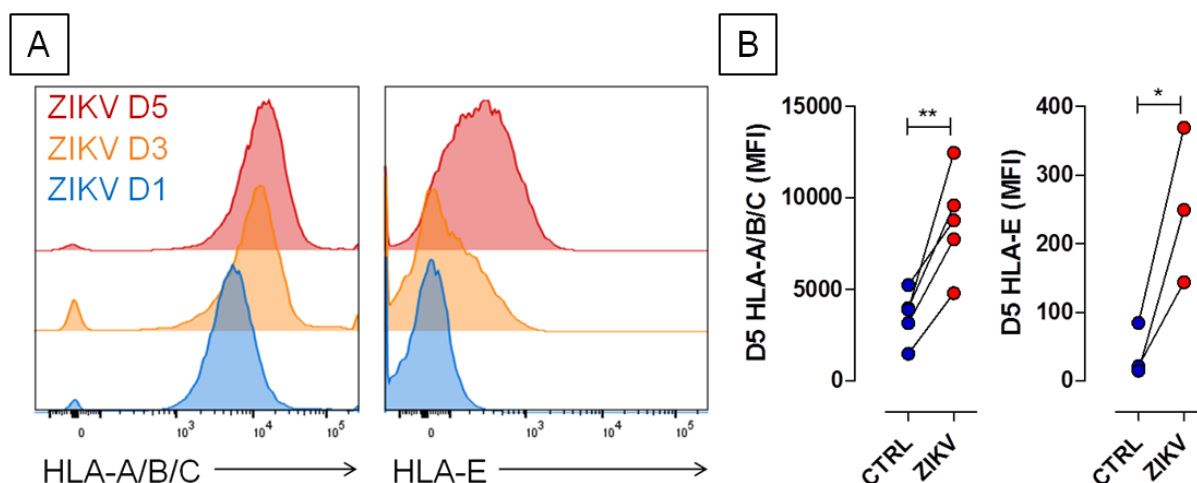


Figure 55 : Expression des molécules de CMH-I lors de l'infection des DSC par le ZIKV.

Les DSC ont été infectées par le ZIKV à une MOI de 1. Après l'infection, les cellules ont été lavées et remises en culture avant leur analyse par cytométrie en flux.

(A) Expression de molécules de CMH-I classiques (HLA-A/B/C) et non classiques (HLA-E) sur les DSC infectées par ZIKV depuis 1 (en bleu), 3 (en orange) ou 5 jours (en rouge).

(B) Quantification du niveau d'expression (MFI) de HLA-A/B/C et HLA-E par les DSC non infectées (CTRL, en bleu) ou infectées par ZIKV depuis 5 jours (ZIKV, en rouge) ; n=5 pour HLA-A/B/C et n=3 pour HLA-E ; t-test apparié ; *P<0.05, **P<0.01.

Après avoir confirmé l'augmentation de CMH-I à la surface des cellules cibles après 5 jours d'infection, nous avons fait une co-culture de 4h en présence de cellules pNK (**Figure 56**). Nous avons utilisé des cellules pNK seules et des cellules pNK traitées à la PMA/Ionomycine comme contrôles négatifs et positifs, respectivement. Nous avons alors observé une augmentation de l'état d'activation uniquement pour les cellules pNK en contact avec les cellules infectées (**Figure 56 A**). Ainsi, au contact de DSC infectées par ZIKV depuis 5 jours, plus de cellules pNK expriment le marqueur d'activation CD69 (%) ; et les cellules qui l'expriment ont une densité antigénique (MFI) plus importante à leur surface (**Figure 57 B**). De manière intéressante, l'état d'activation des cellules pNK (CD69) est corrélé à l'augmentation de l'expression de HLA-A/B/C par les DSC infectées (**Figure 56 C**), suggérant que les cellules pNK s'activent uniquement quand l'infection est bien établie. Enfin, nous n'avons analysé la capacité cytotoxique des cellules pNK à travers l'expression du marqueur de dégranulation (CD107a) (**Figure 56 D-E**). Nous n'avons cependant observé aucune différence entre les DSC infectées et non infectées. Ainsi, même si les cellules pNK sont capables de détecter les cellules infectées et de s'activer, il semblerait que cet état d'activation soit insuffisant pour déclencher les fonctions effectrices des cellules pNK.

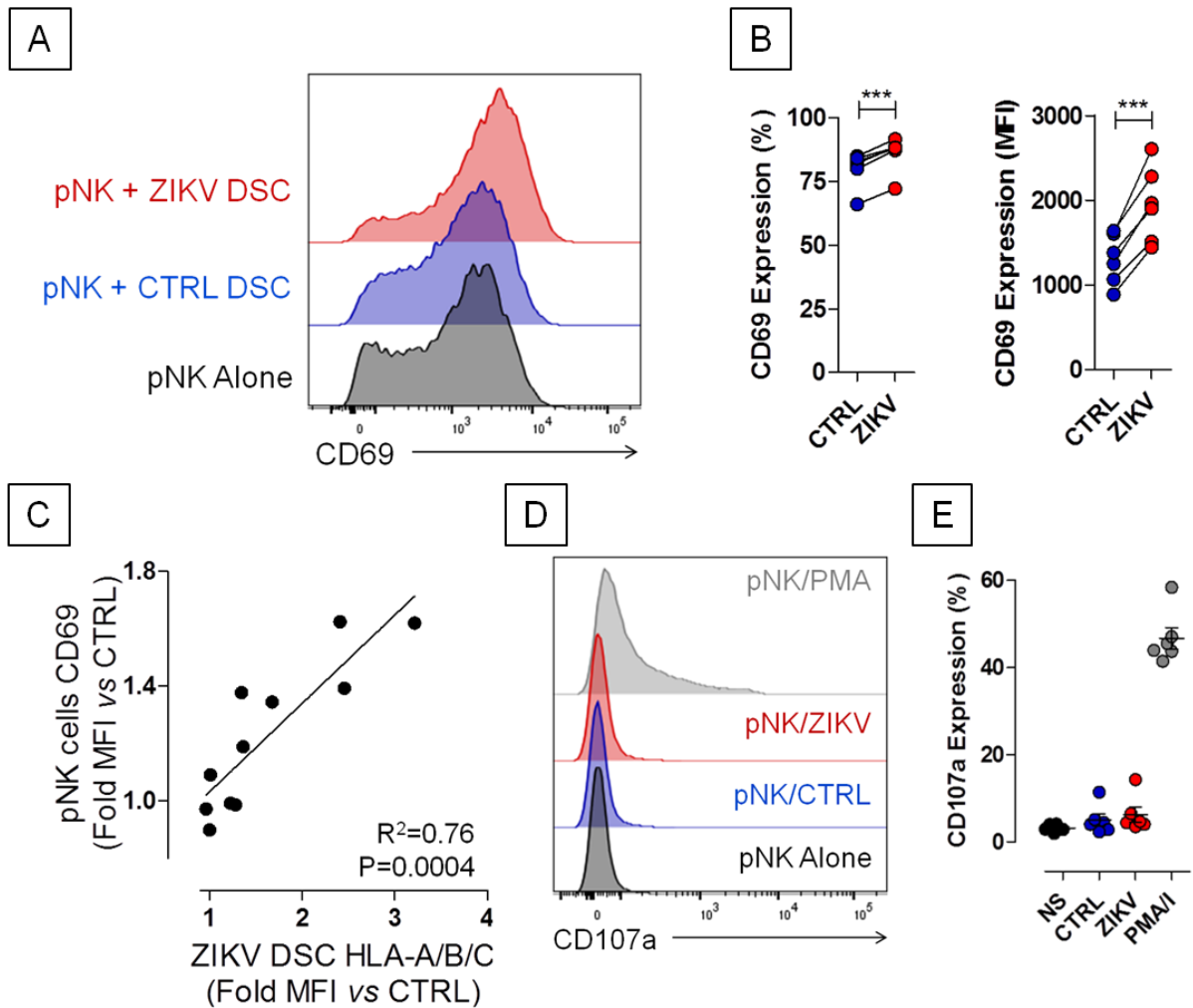


Figure 56 : Activation des cellules pNK lors de l'infection des DSC par le ZIKV. Les DSC ont été infectées par le ZIKV à une MOI de 1. Après l'infection, les cellules ont été lavées et remises en culture avant l'ajout de cellules pNK et l'analyse par cytométrie en flux. **(A)** Expression du marqueur d'activation CD69 sur les cellules pNK seules ou en co-culture pendant 4 heures avec des DSC infectées (ZIKV) ou non (CTRL) depuis 5 jours. **(B)** Quantification du pourcentage (%) et du niveau d'expression (MFI) de CD69 sur les cellules pNK stimulées pendant 4 heures avec des DSC infectées (ZIKV, en rouge) ou non (CTRL, en bleu) depuis 5 jours ; n=6 donneurs indépendants de cellules pNK ; t-test apparié ; ***P<0.001. **(C)** Corrélation entre l'augmentation de l'expression HLA-A/B/C sur les DSC et l'augmentation de l'expression de CD69 sur les cellules pNK au contact des cellules infectées. Chaque point représente le « fold-increase » des MFI de HLA-A/B/C et de CD69 par rapport aux conditions où les DSC ne sont pas infectées (CTRL). La valeur de P du test de corrélation de Spearman et le coefficient de détermination (R^2) de la régression linéaire sont indiqués sur le graphe.

(D) Expression du marqueur de dégranulation CD107a à la surface des cellules pNK non stimulées (Alone), stimulées avec PMA/Ionomycine (PMA) ou en co-culture pendant 4 heures avec des cellules stromales infectées (ZIKV) ou non (CTRL) depuis 5 jours.

(E) Quantification du pourcentage (%) d'expression de CD107a par les cellules pNK non stimulées (NS, en noir), stimulées avec PMA/Ionomycine (50ng/ml et $1\mu\text{M}^{-1}$ respectivement, en gris) ou en co-culture avec des DSC infectées (ZIKV, en rouge) ou non (CTRL, en bleu) depuis 5 jours ; n=6 donneurs indépendants de cellules pNK. Les graphes indiquent la valeur moyenne et les barres d'erreurs représentent la SEM.

Aux vues de nos premiers résultats, et en accord avec la littérature, il semblerait que l'infection par le ZIKV s'accompagne d'une augmentation des molécules de CMH-I qui empêcherait la réponse effectrice des cellules pNK. Cependant, à la différence des cellules pNK, les cellules dNK sont constitutivement activées et sont constamment à proximité des DSC [652]. Ainsi, lors de l'infection des DSC par le ZIKV, les cellules dNK pourraient répondre de manière précoce, permettant alors de contrôler l'infection. Pour tester cette possibilité, nous avons infecté des DSC comme précédemment et analysé l'impact de l'infection sur les cellules dNK autologues (**Figure 57 A-E**). Nous avons alors mis en évidence que la présence des cellules dNK permet d'inhiber fortement la production virale dans les DSC (**Figure 57 A-B**). Afin de déterminer si un contact cellulaire est nécessaire à la fonction des cellules dNK, les expériences de co-cultures ont été réalisées en transwell, qui ne peut laisser passer que les facteurs solubles (**Figure 57 A et C**). Ces expériences nous ont permis de montrer qu'en transwell, les cellules dNK sont toujours capables d'inhiber la production virale dans les DSC (**Figure 57 C**). Cette inhibition reste cependant significativement plus faible que celle obtenue pour les cellules dNK en co-culture directe (94% vs 99%). Nous avons ensuite vérifié si ce contrôle est aussi efficace lorsque l'infection est déjà établie. Pour ce faire, nous avons réalisé des expériences de co-cultures mais en rajoutant les cellules dNK après un ou deux jours post-infection et avons quantifié l'ARN viral dans les surnageants de cultures (**Figure 57 D-E**). Nous avons alors observé que, plus les cellules dNK sont rajoutées tard, plus le contrôle de l'infection était réduit. Ainsi, 15% du contrôle est perdu au jour 5 lorsque les cellules dNK sont rajoutées deux jours post-infection (**Figure 57 E**). Enfin, étant donné que l'IFN- γ est la principale cytokine effectrice produite par les cellules NK, nous avons testé son effet sur l'infection des DSC (**Figure 57 F**) mais aussi sur l'infection des dM (**Figure 57 G**). Nous avons ainsi pu montrer que, de manière similaire aux cellules dNK, l'IFN- γ permet un contrôle efficace de la production de ZIKV dans les deux types cellulaires testés.

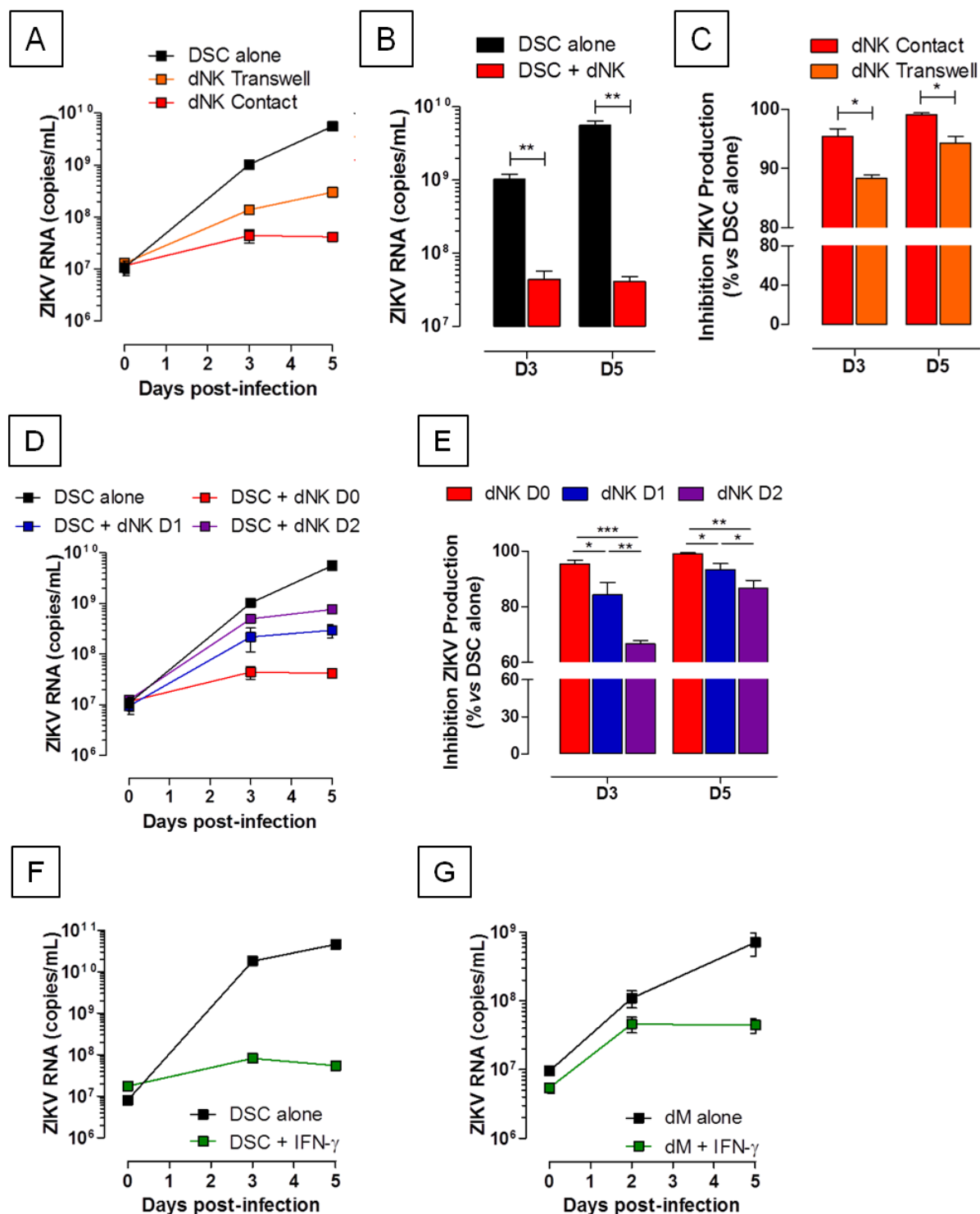


Figure 57 : Contrôle de l'infection par ZIKV via les facteurs solubles des cellules dNK.

Les DSC ont été infectées par le ZIKV à une MOI de 1. Après l'infection, les cellules ont été lavées et remises en culture seules (en noir) ou en présence de cellules dNK autologues.

(A-C) Les cellules dNK ont été rajoutées en co-culture directe (en rouge) ou séparées des DSC par un transwell (en orange). **(A)** Cinétique de production virale du ZIKV dans les DSC déterminée par qRT-PCR ; n=4 donneurs indépendants. **(B)** Inhibition de la production virale de ZIKV dans les DSC par les cellules dNK au jour 3 (D3) ou 5 (D5) post-infection. **(C)** Le

pourcentage d'inhibition a été calculé, au D3 ou J5 post-infection, par rapport aux DSC infectées par ZIKV et cultivées en absence de cellules dNK. Comparaison du pourcentage d'inhibition de la production virale de ZIKV par les cellules dNK en co-culture directe (en rouge) ou séparées par un transwell (en orange).

(D-E) Les cellules dNK ont été rajoutées en co-culture avec les DSC directement (D0, en rouge), 1 jour (D1, en bleu) ou 2 jours (D2, en violet) après l'infection. **(D)** Cinétique de production virale du ZIKV dans les DSC déterminée par qRT-PCR ; n=4 donneurs indépendants. **(E)** Comparaison du pourcentage d'inhibition de la production virale de ZIKV par les cellules dNK rajoutées directement (D0, en rouge), 1 jour (D1, en bleu) ou 2 jours (D2, en violet) après l'infection.

(F-G) Les DSC **(F)** ou les dM **(G)** ont été infectés par le ZIKV à une MOI de 1. Après lavage, les cellules ont été remises en culture seules (en noir) ou en présence d'IFN- γ (100ng/ml, en vert). La cinétique de production virale du ZIKV a ensuite été déterminée par qRT-PCR. n=1 donneur pour les DSC et n=7 donneurs pour les dM.

Les graphes indiquent la valeur moyenne et les barres d'erreurs représentent la SEM ; t-test apparié ou one-way ANOVA avec test post-hoc de Tukey ; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

En conclusion de cette partie, nous avons mis en évidence que les cellules dNK sont capables de contrôler l'infection par le ZIKV à l'interface mère-fœtus. Même si un contact avec les cellules infectées est nécessaire pour avoir une inhibition optimale, la sécrétion de facteurs solubles et notamment d'IFN- γ jouerait un rôle primordial dans le contrôle de l'infection. Enfin, le contrôle précoce de l'infection est partiellement perdu lorsque l'infection est bien établie. L'importance de ces travaux et les expériences nécessaires pour poursuivre ce projet seront détaillés dans la partie Discussion.

III. Le microenvironnement cytokinique décidual lors de la grossesse régule la fonction des cellules NK via l'épissage alternatif des récepteurs NKp30 et NKp44

Comme précisé dans l'introduction, les cellules dNK ont un phénotype unique et des fonctions bien distinctes de leurs homologues du sang périphérique (pNK). Cette différence fonctionnelle est surtout visible pour les récepteurs NKp30 et NKp44, tous deux membres de la famille des NCR. En effet, bien que le récepteur NKp30 soit exprimé par les cellules dNK, son engagement ne permet pas de déclencher la fonction cytotoxique de ces cellules [653]. Concernant NKp44, ce récepteur est constitutivement exprimé par les cellules dNK alors qu'il est inducible dans les cellules pNK. De plus, il a été montré par notre équipe que ce récepteur activateur a des fonctions inhibitrices dans les cellules dNK [685]. Ces différences fonctionnelles pourraient s'expliquer par l'expression de différentes isoformes de ces récepteurs. En effet, les gènes qui codent pour NKp30 et NKp44 sont soumis à un épissage alternatif qui donne lieu à plusieurs transcrits. Par exemple, NKp30 possède trois transcrits différents qui codent pour des isoformes du récepteurs aux fonctions différentes, allant de l'activation à l'immuno-modulation [281]. De plus, certains transcrits de NKp44 ont un exon supplémentaire qui code pour une portion intracellulaire contenant un motif ITIM [280].

Mon équipié avait initié une étude comparative de l'expression des différents transcrits de NKp30 et NKp44 entre les cellules dNK et pNK issus des mêmes donneuses. Cette analyse a démontré que, à la différence des cellules pNK, les cellules dNK expriment majoritairement les transcrits associés aux fonctions régulatrices (NKp30c et NKp44c). Elle a également confirmé que l'expression différentielle de ces isoformes est responsable des différences fonctionnelles de ces deux récepteurs dans les cellules dNK et pNK. Dans le cadre de mon Master et de la première année de ma thèse, nous avons essayé de comprendre les mécanismes qui régulent l'expression des transcrits de NKp30 et NKp44 et qui dictent le phénotype décidual des cellules dNK. Nous avons analysé l'effet des différentes cytokines sur le phénotype et la fonction des cellules NK et avons défini un cocktail de cytokines enrichies à l'interface mère-fœtus (TGF- β , IL-15 et IL-18), qui permet de convertir des cellules pNK cytotoxiques en cellules tolérogènes avec un phénotype « decidual-like ». Nous avons également pu montrer que ce microenvironnement cytokinique modifie l'expression des isoformes de NKp30 et NKp44 des cellules pNK vers un profil « dNK-like ». Nous avons ensuite caractérisé les modifications phénotypiques de ces cellules et montré que cette conversion des cellules pNK est associée à l'expression de marqueurs tissulaires de cellules dNK tels que CD9, CD49a et CD103. Enfin, nous avons montré que la modification des

transcrits de NKp30 et NKp44 par le microenvironnement cytokinique modifie les fonctions effectrices après engagement spécifique de ces récepteurs. Ainsi, les cellules « dNK-like » ont une activité cytotoxique et une sécrétion d'IFN- γ , TNF- α , CCL-3 et CCL-4 réduites après engagement de NKp30 et NKp44. Au contraire, elles augmentent leur sécrétion de VEGF-A, un facteur de croissance abondamment produit par les cellules dNK.

En conclusion, ces travaux ont mis en évidence l'importance du microenvironnement cytokinique dans le contrôle du phénotype et de la fonction des cellules dNK. De plus, ils ont permis de montrer l'importance des variants d'épissage des récepteurs NKp30 et NKp44 dans le contrôle des fonctions effectrices des cellules dNK durant la grossesse. L'ensemble de ces travaux, dont je suis deuxième auteur, a été publié le 15 décembre 2015 dans *Nature Communications* [1011].

ARTICLE

Received 15 Sep 2015 | Accepted 12 Nov 2015 | Published 15 Dec 2015

DOI: 10.1038/ncomms10183

OPEN

Natural cytotoxicity receptor splice variants orchestrate the distinct functions of human natural killer cell subtypes

Johan Siewiera^{1,2,3}, Jordi Gouilly^{1,2,3}, Hocine-Rachid Hocine⁴, Géraldine Cartron⁵, Claude Levy⁶, Reem Al-Daccak^{4,*} & Nabila Jabrane-Ferrat^{1,2,3,*}

The natural cytotoxicity receptors NKp46/NCR1, NKp44/NCR2 and NKp30/NCR3 are critical for natural killer (NK) cell functions. Their genes are transcribed into several splice variants whose physiological relevance is not yet fully understood. Here we report that decidua basalis NK (dNK) cells of the pregnant uterine mucosa and peripheral blood NK (pNK) cells, two functionally distinct subsets of the physiological NK cell pool, display differential expression of NKp30/NCR3 and NKp44/NCR2 splice variants. The presence of cytokines that are enriched within the decidual microenvironment is sufficient to convert the splice variant profile of pNK cells into one similar to that of dNK cells. This switch is associated with decreased cytotoxic function and major adaptations to the secretome, hallmarks of the decidual phenotype. Thus, NKp30/NCR3 and NKp44/NCR2 splice variants delineate functionally distinct NK cell subsets. To our knowledge, this is the first conclusive evidence underlining the physiological importance of NCR splice variants.

¹INSERM UMR 1043, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan (CPTP), Toulouse F-31300, France. ²CNRS UMR 5282, Toulouse F-31300, France. ³Université Toulouse III Paul Sabatier, CHU Purpan BP 3028, Toulouse F-31300, France. ⁴INSERM UMRS976 and Université Paris-Diderot, Hôpital Saint Louis, Paris 75010, France. ⁵Service de Gynécologie-Obstétrique, Centre Hospitalo-Universitaire de Toulouse, Hôpital Paule de Viguer, Toulouse 31059, France. ⁶Service de Gynécologie-Obstétrique Clinique Sarrus-Teinturiers, Toulouse 31300, France. * These authors jointly supervised this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to N.J.-F. (email: nabila.jabrane-ferrat@inserm.fr).

Natural killer (NK) cells are a pool of innate immune cells that play a key role in controlling pathological situations such as viral infections and tumours, as well as more physiological ones such as pregnancy. NK cell effector functions are orchestrated by a wide array of germline-encoded receptors (NKR) that are expressed in a stochastic pattern. Natural cytotoxicity receptors (NCRs) are among the major activating NKRs that recognize as yet unidentified self-ligands^{1–3}. NCRs belong to the immunoglobulin-like family and are involved in NK cell cytotoxic function against infected cells and tumours^{4–7}. The NCRs NKp46/NCR1 and NKp30/NCR3 are expressed on resting and upregulated on activated NK cells, whereas NKp44/NCR2 is expressed only on activated cells. NCR genes can be transcribed into several splice variants^{4,8}. NCR3 can be transcribed into six different splice variants, with NKp30a, NKp30b and NKp30c being the most abundant isoforms each with distinct functions⁹. NKp30a and NKp30b convey stimulatory signals, whereas NKp30c is immunosuppressive¹⁰. NCR1 and NCR2 also encode several splice variants^{4,8}, but whereas no functional differences have been observed for the NCR1 splice variants, studies on NCR2 have suggested the presence of an inhibitory isoform¹¹. Although these studies have shed light on the various NCR alternative splice variants, the physiological and biological relevance of the various NCR isoforms is far from being fully resolved.

Peripheral blood NK (pNK) cells and decidua basalis NK (dNK) cells from the pregnant uterus lining are two distinct subsets of the physiological NK cell pool. They are clearly different at both phenotypic and functional levels^{12–17}. In contrast to pNK cells that are CD56^{dim}CD16^{pos}, most of dNK cells are CD56^{bright}CD16^{neg}. Furthermore, dNK cells express a unique repertoire of activating and inhibitory NKRs. Although resting pNK cells do not express the NKp44 receptor, dNK cells express all three NCRs. Very little is known about the origin of dNK cells. It is thought that they could derive from NK cell progenitors and/or mature pNK cells that migrate/proliferate/differentiate in a local environment enriched in steroids and cytokines/chemokines^{18–23}. Mouse studies have revealed a unique functional role of dNK cells in supporting the implantation of the embryo^{24,25}. The dNK cells recruited to the early implantation site of mouse decidua basalis secrete numerous factors that contribute to both neo-angiogenesis of early decidual vessels and alterations to the structural components of newly developing and existing vessels. Likewise, human dNK cells actively participate in neo-angiogenesis and contribute towards fetal trophoblast differentiation/invasion and vascular remodelling^{14,26,27}. Similar to pNK cells, dNK cells are also involved in the immune response against various threats¹⁶.

The molecular basis underlying the differential functions of these two NK cell subsets has not been fully elucidated. Studies on the function of the NCRs suggest that they might each play discreet roles. Although all three NCRs have been shown to induce pNK cell cytotoxicity and cytokine production, only NKp46/NCR1 was able to induce dNK cell cytotoxicity¹³. Moreover, NKp30/NCR3 was shown to promote cytokine secretion, whereas NKp44/NCR2 was found to have an inhibitory function in dNK cells^{13,14,16}. Herein, we examined whether the expression of alternatively spliced variants of the NCRs might delineate these two NK cell subsets and explain their differential function. Analysis of a cohort of dNK and pNK cells from the same donors demonstrates that first-trimester dNK cells express NCR isoforms that are different from those expressed by pNK cells. We find that this differential expression might be physiologically relevant. It considerably has an impact on the lytic activity of dNK cells and is sculpted by cytokines enriched within the decidual microenvironment (decidua-enriched cytokines) that select for the expression of inhibitory rather than activating

isoforms of NKp30/NCR3 and NKp44/NCR2. To our knowledge, this is the first study proposing a biological relevance to the various NCR isoforms, whose expression defines the pNK and dNK cell subsets at the molecular level, as well as their differential functions.

Results

NCR variants control NK cell subsets degranulation. NCR engagement triggers different effector functions in dNK cells compared with pNK cells¹³. We investigated whether alternatively spliced variants of NCR might underpin the differences between these two NK cell subsets in a cohort of dNK and pNK cells from the same donors. We performed *in silico* multiple sequence alignment of the NKp30/NCR3 and NKp44/NCR2 isoform coding sequences, then designed specific primers to depict the three major isoforms of each receptor and verified their specificity by reverse-transcription PCR (RT-PCR) (Supplementary Fig. 1 and Table 1).

Consistent with both a previous report¹⁰ and our RT-PCR results, pNK cells predominantly expressed NKp30a and NKp30b messenger RNA but almost no NKp30c mRNA (Fig. 1a). In contrast, dNK cells expressed significantly lower amounts of NKp30a and NKp30b mRNA but very high levels of NKp30c mRNA (Fig. 1a). Compared with pNK cells, dNK cells expressed at least tenfold more NKp30c. On the other hand, dNK cells displayed similar expression levels of all three NKp44 mRNAs, whereas pNK cells exclusively expressed NKp44b mRNA (Fig. 1b). The relative ratios further demonstrated that freshly isolated pNK cells expressed NKp44b mRNA at levels that were greater than NKp44a and NKp44c mRNA. Levels of NKp44a and NKp44c mRNA in dNK cells were at least three and four times higher than in pNK cells, respectively.

To examine the relevance of the observed differences in NCR isoform expression profiles in dNK versus pNK cells, we investigated their impact on NK cell effector functions. We monitored the cellular degranulation of dNK and pNK cells on NCR ligation as readout of lytic activity. As freshly isolated pNK cells, in contrast to dNK cells, lack the cell surface expression of NKp44, therefore they were cultured overnight with 10 ng ml^{–1} of interleukin-15 (IL15). These CD3^{neg}CD56^{pos} pNK and dNK cells were activated for 4 h with specific anti-NCR antibodies, then analysed for cell surface expression of the CD107a degranulation marker. Ligation of the NKp30, NKp44 or the IgG isotype-matched control on dNK cells did not increase the CD107a expression, whereas ligation of NKp46 induced degranulation in 18% of dNK cells (Fig. 1c).

Table 1 Sequences of forward and reverse primers used for PCR analyses.		
Name		Sequence
Actin	Forward	5'-CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC-3'
Actin	Reverse	5'-GCTCGTCGTTTCGACAACGGCT-3'
NKp30/NCR3	Forward	5'-TTTCTCCATGACCAACAGG-3'
NKp30/NCR3 (a)	Reverse	5'-GGACCTTTCCAGGTCAGACATT-3'
NKp30/NCR3 (b)	Reverse	5'-CGGAGAGAGTAGATTTGGCATATT-3'
NKp30/NCR3 (c)	Reverse	5'-TTCCCATGTGACAGTGGCATT-3'
NKp44/NCR2 (a)	Forward	5'-AAGCCCTGAGTCTCCATCT-3'
NKp44/NCR2 (a)	Reverse	5'-GTTTTCCACCATATGTCCCCC-3'
NKp44/NCR2 (b)	Forward	5'-TTCACAGACCCAGACCCAGAG-3'
NKp44/NCR2 (b)	Reverse	5'-AGGACGGGTGTGAAGGGACA-3'
NKp44/NCR2 (c)	Forward	5'-GTCCCTTCACAGCCACAGAA-3'
NKp44/NCR2 (c)	Reverse	5'-GAGACCTCCCTTGATGCTGC-3'

Primers were designed using NCBI Blast and purchased from Sigma (Sigma, France).

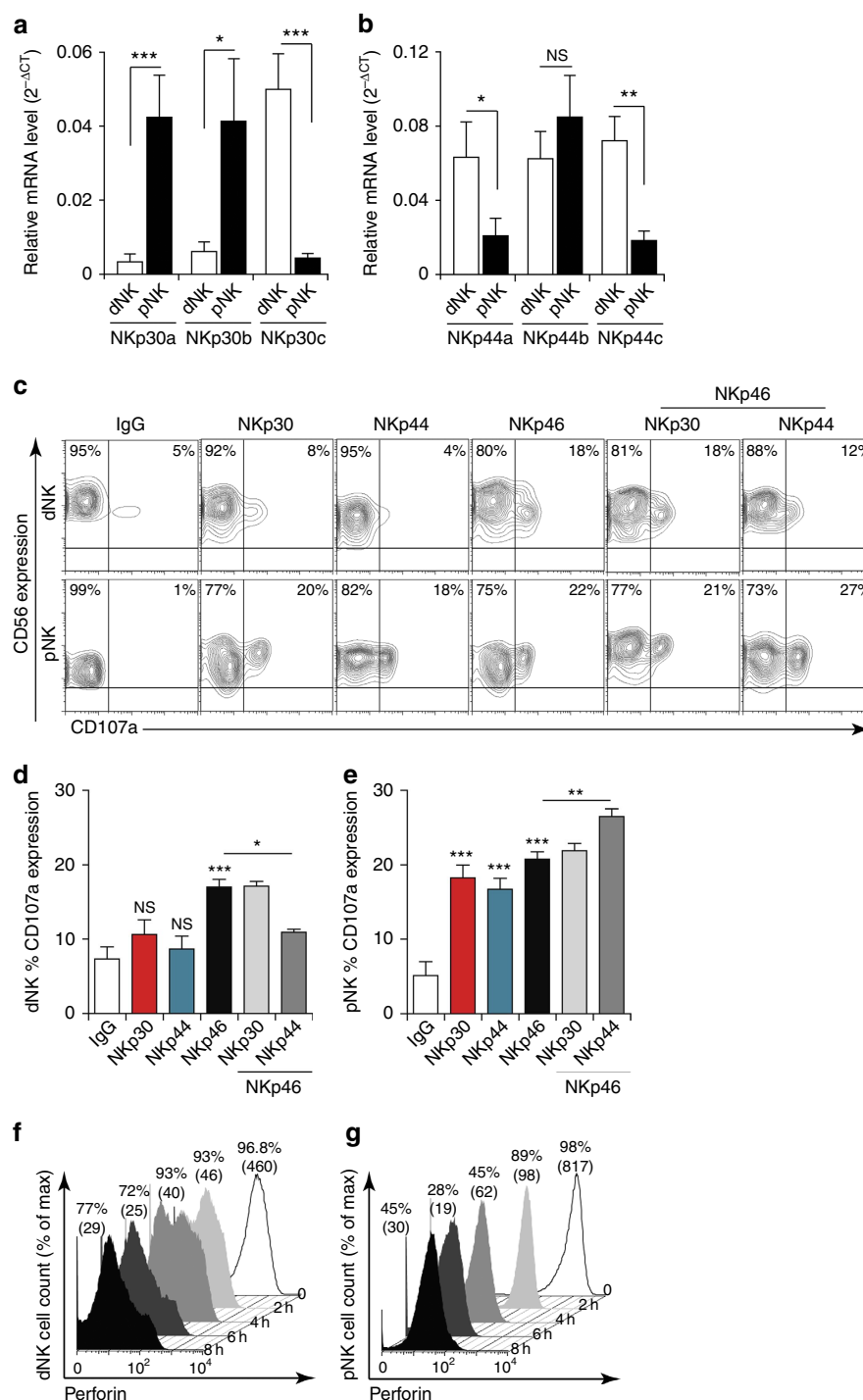


Figure 1 | Differential expression of NCR isoforms by dNK and pNK cells results in differential activation on receptor cross-linking. (a,b) mRNA was extracted from freshly isolated dNK and pNK cells from the same donor (ten matched donor samples). Quantitative reverse-transcription PCR was used to measure the relative expression of the three NKp30/NCR3 (a) and NKp44/NCR2 (b) splice variants. Data are representative of ten independent donors. Bar graphs show mean values \pm s.e.m. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$; NS, not significant; Student's *t*-test. (c,d,e) Freshly isolated dNK and pNK cells cultured overnight with IL15 (10 ng ml^{-1}) were stimulated for 4 h with a single or combination of two specific monoclonal antibodies, used as ligands. (c) NK cell degranulation was assessed by quantification of CD107a cell surface expression using flow cytometry on CD3^{neg}CD56^{pos} cells. (d) Percentage of freshly isolated dNK cells and (e) pNK cells showing CD107a surface expression. Results are presented as mean values \pm s.e.m. from four independent donors. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; NS, not significant; one-way analysis of variance with Bonferroni post test. (f,g) Representative experiment showing the kinetics of intracellular perforin expression monitored for 8 h in the presence of polyclonal stimulation with ionomycin/phorbol myristate acetate (PMA; $n = 4$). The percentage of NK cells expressing perforin is given above each FACS histogram; MFI values are shown in brackets.

Co-engagement of the NKp44 and NKp46 receptors decreased NKp46-induced degranulation by $> 30\%$ in dNK cells, whereas co-ligation of NKp30 had no effect (Fig. 1c,d). In line with

previous reports^{28–30}, NKp30, NKp44 and NKp46 ligation all resulted in a significant increase in CD107a expression in pNK cells (Fig. 1c,e). Simultaneous ligation of NKp44 and NKp46

showed an incremental effect on the ability of pNK cells to degranulate, whereas co-engagement of NKp30 and NKp46 had no impact on NKp46-induced degranulation (Fig. 1c,e).

For a complete assessment, we also monitored NK cell degranulation by adding the anti-CD107a antibody and the intracellular transport blocker monensin during the whole stimulation period. The degranulation profiles of pNK cells were similar to those observed when anti-CD107a antibody was added at the end of the degranulation assay. The cumulative increase in CD107a over time was much more pronounced for pNK than for dNK cells (Supplementary Fig. 2a). However, as the baseline level of degranulation was much higher for dNK cells we cannot exclude an eventual side effect of the intracellular transport blocker on dNK cells.

To ensure that the difference observed between dNK and pNK cell was not due to defective dNK cell degranulation, we stimulated the cells with phorbol myristate acetate/ionomycin and monitored their perforin contents over time. In agreement with previous reports^{27,31}, even though dNK expressed less perforin than pNK cells at the baseline level, 100% of cells of both subsets expressed perforin and were similarly able to degranulate on optimal stimulation (Fig. 1f,g).

Together, these data demonstrate that the differential expression of NKp30 and NKp44 splice variants by dNK and pNK cells delineates their differential ability to release lytic granules on specific receptor engagement. Thus, the molecular individualization of dNK and pNK cells might be of functional and/or biological relevance.

NCRs splice variants affect NK-cell immune synapse formation.

NK cell functions are governed by signalling pathways activated on their receptors ligation and consequent immune synapse (IS) formation. To validate the relevance of the differences in the dNK and pNK subsets, we first analysed some of intracellular signalling events downstream of the NCRs. Ligation of NKp46 on dNK and pNK cells led to fairly similar tyrosine phosphorylation patterns (Supplementary Fig. 2b and Supplementary Methods). However, ligation of NKp30 and NKp44 induced differential tyrosine phosphorylation patterns in the two cell types. We also analysed the phosphorylation of Vav1 and mitogen-activated protein kinase/Erk. Again NKp46 induced fairly similar Vav1 phosphorylation in both cell subsets. NKp30 induced Vav1 phosphorylation mainly in pNK cells, whereas NKp44 induced its phosphorylation mainly in dNK cells. Activation of the mitogen-activated protein kinase/Erk pathway was less clear. NKp30 and NKp46, but not NKp44, appeared to activate Erk1/2 phosphorylation in pNK but not in dNK cells (Supplementary Fig. 2b). Although warranted further investigation, these results suggest that the differential expression of NKp30 and NKp44 isoforms by dNK and pNK cells could lead to differential activation of intracellular signalling on specific ligation of these NCRs.

We then examined the organization of ISs after ligation of a single NCR. IS formation is usually associated with cortical actin remodelling. The organization of actin-containing micro-domains at the vicinity of the microtubule organizing centre (MTOC) serves as a docking site for lytic granules³². NKp30 ligation on cells from the two NK cell subsets resulted in the rapid reorganization of F-actin-enriched cytoskeleton and the polarization of the MTOC. By counting cells showing a polarized MTOC and perforin-containing granules, we found that >45% of pNK cells displayed polarized IS (Fig. 2a). In contrast, <20% of dNK cells displayed polarized lytic granules after NKp30 ligation. Similar to NKp30, NKp44 ligation induced organized IS in >50% of pNK cells, whereas only minor effects were seen in dNK cells (Fig. 2b). In agreement with the degranulation assay,

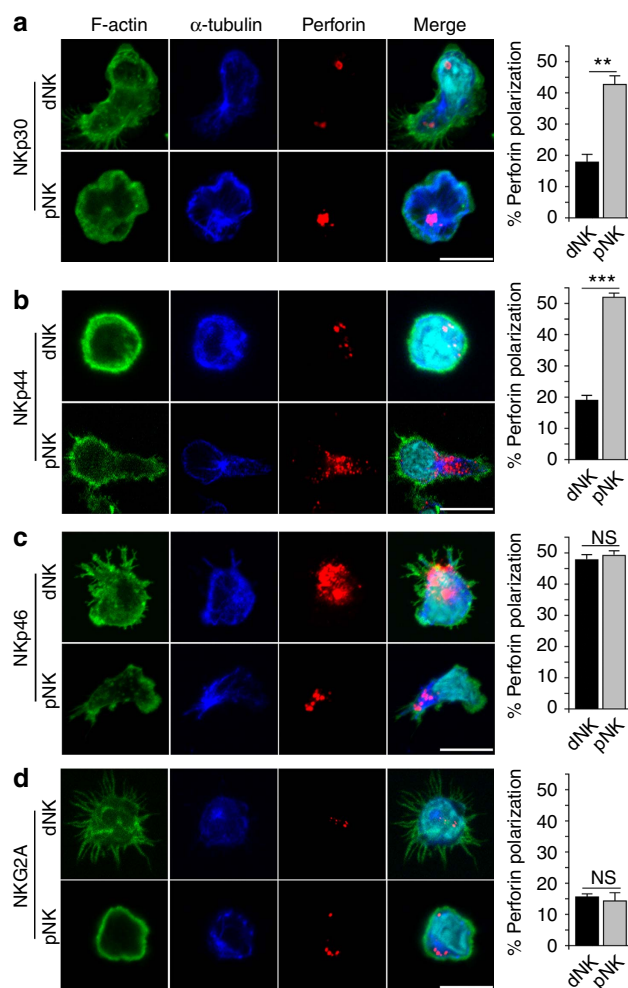


Figure 2 | Specific ligation of NCRs leads to differential IS formation.

(a–d) Representative images of IS formation on specific engagement of NCRs of dNK or pNK cells cultured overnight with IL15 stimulated on glass coverslip surfaces coated with anti-NKp30 (a), anti-NKp44 (b), anti-NKp46 (c) and anti-NKG2A (d) antibodies. Representative images of NK cells and antibody-coated glass coverslips were acquired with a Zeiss LSM710 confocal microscope using a $\times 63$ oil objective (Carl Zeiss AG, Jena, Germany). Polarization was imaged after 20 min of stimulation. F-actin (phalloidin in green), microtubules (α -tubulin in blue) and lytic granules containing perforin (red) were stained. Scale bar, 20 μ m. Images were processed using ImageJ software. Bar graphs (right panel) represent the percentage of conjugates showing polarized perforin after receptor engagement. At least 300 conjugates were analysed. Results are given as average mean values \pm s.e.m. from five independent experiments.

** $P < 0.01$; NS, not significant; Student's *t*-test.

activation through NKp46 ligation had similar effects in pNK and dNK cells with almost 50% of cells sharing features of cytolytic IS (Fig. 2c). As a negative control, <20% of cells exhibited organized IS after ligation of the NKG2A inhibitory receptor (Fig. 2d).

Overall, and in line with the degranulation activities, all three NCRs induced pNK cell lytic IS formation, whereas only NKp46 ligation triggered lytic IS in dNK cells. This further supports that the differential expression of NCR splice variants by dNK and pNK cells could contribute to their distinct functioning.

Decidua-enriched cytokines modulate NCR isoform expression.

The above findings prompted us to investigate the elements that

might contribute towards sculpting the expression profile of NCR splice variants in NK cell subsets. dNK and pNK cells operate within distinct microenvironments. The decidua stroma produces transforming growth factor- β (TGF- β) and the pro-inflammatory IL15 and IL18, which are critical for healthy pregnancy^{33–35}.

We therefore analysed the potential role of these cytokines in altering the expression of NCR splice variants in pNK cells. We evaluated the expression of NKp30 and NKp44 transcripts in pNK cells that were cultured for 6 days in the presence of IL15, IL18 and TGF- β combinations. Compared with untreated pNK cells, IL15 induced a significant increase in NKp30a and NKp30b mRNA (Fig. 3a). TGF- β decreased the relative mRNA levels of all three NKp30 transcripts (Fig. 3a). IL15 tempered the TGF- β effect, although this was not significant. Similar to IL15, IL18 alone increased the level of NKp30a and NKp30b mRNA but its presence did not override the inhibitory effect of TGF- β . Compared with untreated or with TGF- β -treated pNK cells, TGF- β /IL15/IL18 significantly increased NKp30b and NKp30c variants (Fig. 3a). The TGF- β /IL15/IL18 cocktail increased NKp30b and NKp30c levels to a greater extent than NKp30a.

We next examined the expression of NKp44 splice variants. The presence of IL15, IL18 and TGF- β alone or in combination induced a significant change in the expression of NKp44a and NKp44c without considerably affecting the expression of NKp44b mRNA (Fig. 3b). IL15 increased NKp44a and NKp44c levels, whereas IL18 downregulated NKp44a but increased NKp44b and NKp44c. IL15/IL18 in the presence or absence of TGF- β induced the highest upregulation of NKp44a mRNA (Fig. 3b). IL18 was more effective at increasing levels of the NKp44c isoform and again IL15/IL18, in the presence or absence of TGF- β , significantly upregulated its expression (Fig. 3b). Compared with NKp44b, TGF- β /IL15/IL18 induced a significant increase in NKp44a and NKp44c isoforms. Thus, an environment enriched in TGF- β , IL15 and IL18 shifts the expression of NKp30 and NKp44 splice variants in pNK cells towards that of dNK cells.

To assess the significance of such a shift, we analysed the expression level of several NKR (CD56, CD16, CD69, NKp46, NKp44, NKp30, NKG2C and NKG2D). In the presence of TGF- β /IL15/IL18 cocktail, and consistent with a previous report³⁶, pNK cells upregulated their CD56 expression and >98% of the cells become CD56^{bright}. Cells showed a significant increase in mean fluorescence intensity (MFI), with values of 200.6 ± 9.6 compared with 20.7 ± 2.6 observed for cells cultured in cytokine-free medium; thus, the pNK cells had reached levels comparable to those observed for dNK cells (259 ± 8.4 ; Fig. 3d). A lower CD56 MFI increase was also observed when pNK cells were cultured with IL15 (117 ± 12) or TGF- β /IL15 (164 ± 4 ; Supplementary Fig. 3b). The presence of IL15 also significantly increased CD69 expression. CD69, barely detected in freshly isolated pNK cells (Fig. 3a), was expressed by >40% of IL15-, IL15/IL18- or TGF- β /IL15/IL18-cultured pNK cells (MFI of 38.4 ± 5), reaching a level similar to that of dNK cells (MFI of 45 ± 5 ; Fig. 3c,d and Supplementary Fig. 3b). IL15 alone or in combination with IL18, TGF- β or both also allowed the maintenance of CD16 expression in >70% of cells and none of the cytokine combinations altered the CD16 expression in pNK cells (Supplementary Fig. 3a,b).

More than 60% of pNK cells expressed NKp30 and the presence of IL15 promoted this expression (Supplementary Fig. 3b). TGF- β did not affect the baseline expression of NKp30 but significantly tempered the effect of IL15 or IL15/IL18. The TGF- β /IL15/IL18 combination supported the NKp30 level at a level similar to that of dNK cells (Fig. 3d and Supplementary Fig. 3b). Treatment of pNK cells with IL15 alone or in combination with the other two cytokines induced significant

increase of NKp44 expression in pNK cells (Supplementary Fig. 3b). MFI comparisons showed very low variability among the different donors, with TGF- β /IL15/IL18 treatment increasing the expression of NKp44 in pNK cells and shifting them towards a dNK cell phenotype (Fig. 3d). Finally, the presence of IL15 upregulated the level of NKp46 but the addition of TGF- β had no effect (Supplementary Fig. 3b) and nearly 80% of cells expressed NKp46 at a level similar to that of dNK (Fig. 3c,d).

We also tested whether expression of NKG2C and NKG2D is alerted on treatment with cytokines. Only 60% of TGF- β /IL15/IL18-treated cells expressed the NKG2C receptor with an expression level comparable to that of freshly isolated pNK or dNK cells. Treatment with TGF- β /IL15/IL18 slightly increased the percentage of NKG2D-expressing cells and the level of expression to one comparable to that displayed by dNK cells (Supplementary Fig. 3a,b).

Overall, our data attribute an important role to the cytokine-defined microenvironment in shaping up and maintaining the molecular profiles of transcription of the NKp30/NCR3 and NKp44/NCR2 mRNA splice variants in pNK and dNK cells, and their differential expression of the NKR.

Cytokine-treated pNK cells acquire dNK cell markers. To confirm that TGF- β /IL15/IL18-induced NKp30/NCR3 and NKp44/NCR2 alternative spliced variants polarize pNK cells towards a dNK cell phenotype, we determined the expression of dNK cell-specific markers (CD9, CD49a and CD103)^{27,36} and chemokine receptors CXCR3 and CXCR4, which are differentially expressed in tissue-infiltrating lymphocytes^{18,21,37}. pNK cells did not express CD9, CD49a and CD103 or the chemokine receptor CXCR4 (Fig. 4a,b). However, both cell subsets expressed the chemokine receptor CXCR3. IL15, IL18 or a combination of both cytokines did not affect the expression of dNK cell-specific markers or the expression of the chemokine receptors (Supplementary Fig. 4a). The presence of TGF- β alone increased the expression of CD9, CD49a and CD103 in pNK cells and remarkably increased CXCR3 expression while inducing that of CXCR4 receptors (Supplementary Fig. 4a). The presence of IL15 prompted TGF- β -induced expression of CD9, CD49a and CD103, and maintained TGF- β -induced expression of CXCR3 but decreased CXCR4 to the dNK cell levels (Supplementary Fig. 4a). Again, the TGF- β /IL15/IL18 combination induced the most significant increase of dNK-specific markers in pNK cells (Fig. 4 and Supplementary Fig. 4a). TGF- β /IL15/IL18-treated pNK cells also expressed both CXCR3 and CXCR4 at levels similar to those of dNK cells. Thus, similar to their effect on the expression of NKp30 and NKp44 splice variants and the differentially expressed receptors, TGF- β /IL15/IL18 cytokines were able to shape the phenotype of pNK cells and shift them towards a dNK cell-specific phenotype. These major changes were not due to cell proliferation or cell death. In fact, only a slight increase in proliferation was observed after 6 days of culture with IL15 and cell death was negligible (Supplementary Fig. 4b–d).

These findings provide further evidence that the phenotype and probably the effector functions of dNK and pNK cells are controlled at least in part by their cytokine-defined microenvironment.

Decidua-enriched cytokines affect pNK cell lytic function. We next tested whether the cytokine-induced NKp30/NCR3 and NKp44/NCR2 changes affected pNK cell lytic function. First, we tested the effect of cytokines on pNK cell perforin content by flow cytometry. Freshly isolated pNK cells expressed high levels of perforin (Fig. 5a). After 6 days of culture in medium alone or in

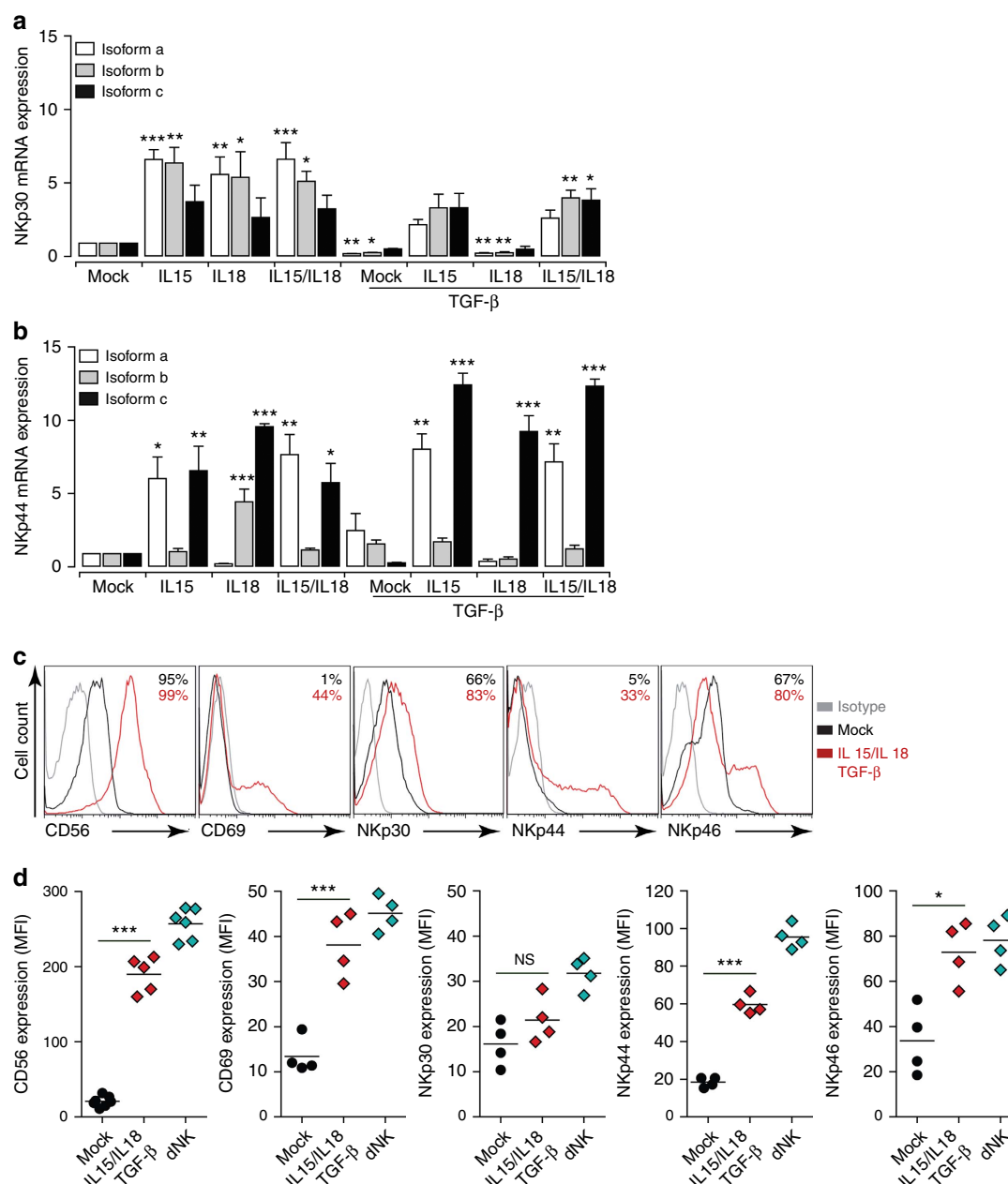


Figure 3 | Decidua-enriched cytokines affect the expression of NCR isoforms and modulate pNK cell phenotype. (a, b) mRNA was extracted from pNK cells that has been cultured for 6 days in media supplemented with IL15, IL18 and TGF- β , alone or in different cytokine combinations. The relative expression of the three NKp30/NCR3 (a) and NKp44/NCR2 (b) splice variants was then determined by quantitative reverse-transcription PCR (qRT-PCR) analysis. The expression of each isoform was compared with that in cells cultured in cytokine-free conditions (mock). Bar graphs represent mean values \pm s.e.m. from four independent experiments. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001; NS, not significant; one-way analysis of variance with Bonferroni post test. (c, d) Modulation of NK cell phenotype by a decidual cytokine cocktail. (c) Flow cytometry analysis showing a representative pNK cell phenotype after 6 days of culture with or without the cytokine cocktail. CD3^{neg}CD56^{pos} NK cells were analysed for the indicated markers (x axis). Isotype matched controls (grey), pNK cells cultured in complete media (continuous black) and pNK cells cultured in media supplemented with the cytokine cocktail (dashed red) are shown. The percentage of positive cells is indicated for each condition. (d) Graphs represent MFI of pNK cells after 6 days of culture with or without the cytokine cocktail and freshly isolated dNK cells. Data on graphs represent mean values \pm s.e.m. from at least four independent donors. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001; NS, not significant; paired Student's t -test.

the presence of TGF- β , even if nearly 100% of pNK cells remained positive for perforin, the expression levels drastically decreased. On treatment with IL15/IL18 or the TGF- β /IL15/IL18 combination, all cells remained positive for perforin but its expression levels significantly decreased (Fig. 5a). The presence of TGF- β /IL15/IL18 cocktail allowed the cells to shift their perforin content to levels similar to that of dNK cells, suggesting that in

the presence of a defined cytokine microenvironment pNK cells could also exhibit a dNK-like cytolytic behaviour.

To verify this, pNK cells were cultured with different cytokine combinations and their lytic function was assessed through analysis of CD107a expression after NCR ligation (Fig. 5b and Supplementary Fig. 5a). As expected, pNK cells cultured in cytokine-free medium showed a low degranulation capacity. The

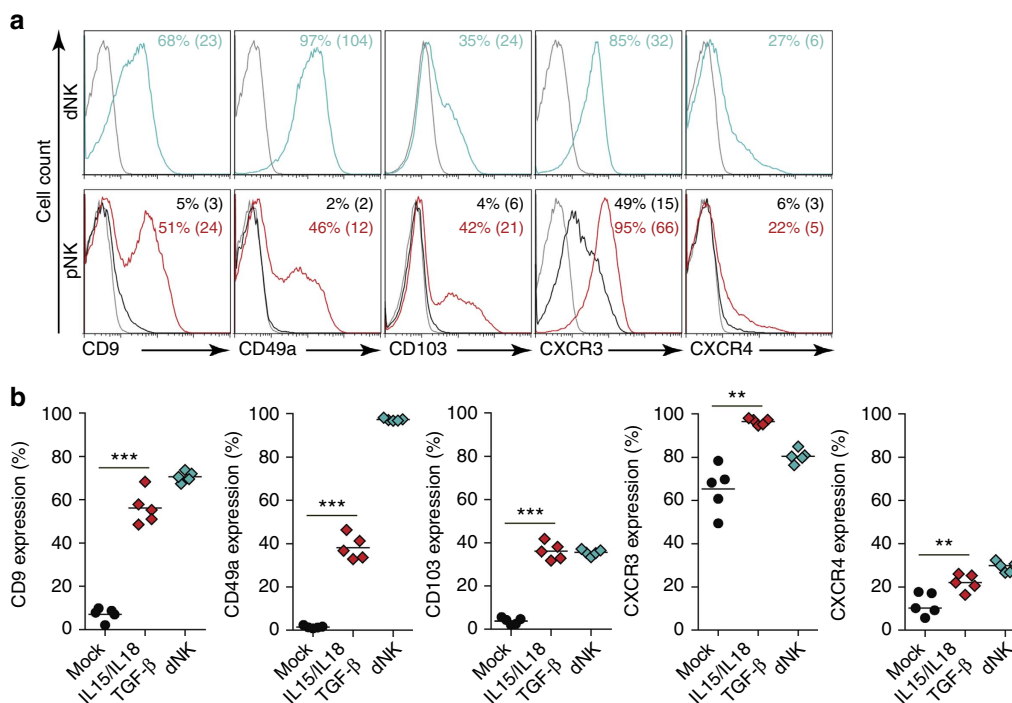


Figure 4 | pNK cells acquire specific dNK cell markers on cytokine treatment. The expression of dNK cell-specific markers was analysed by flow cytometry in freshly isolated dNK cells or in pNK cells after 6 days of culture in media supplemented or not with IL15, IL18 and TGF- β . **(a)** Representative FACS profiles of cytokine-cultured pNK cells and freshly isolated dNK cells showing the expression of dNK cell-specific markers (CD9, CD49a and CD103) and two chemokine receptors that are differentially expressed between the two cell subsets (CXCR3 and CXCR4). The percentage of positives cells and the MFI are given for each marker. **(b)** Data on graphs represent the percentage of freshly isolated dNK cells and pNK cells cultured for 6 days with or without cytokines. Data are mean value \pm s.e.m. from at least four independent donors. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; NS, not significant; paired Student's *t*-test.

IL15-cultured pNK cells significantly degranulated on NKp30, NKp46 and, but to a much lesser extent on, NKp44 ligation (Supplementary Fig. 5a). IL15/IL18 combination showed similar results to IL15 alone (Supplementary Fig. 5a). Treatment with TGF- β did not affect the basal level of CD107a expression in pNK cells. However, the TGF- β /IL15 or TGF- β /IL15/IL18 combinations significantly decreased the capacity of NKp30 and to a much lesser extent NKp44 stimulation to induce CD107a expression. The presence of TGF- β with IL15 or IL15/IL18 slightly reduced the IL15-induced expression of CD107a on engagement of NKp46 but it increased the response induced by NKp46 in untreated pNK cells to a level similar to that of dNK cells (Fig. 5b and Supplementary Fig. 5a).

The co-engagement of NKp30 and NKp46 had no impact on NKp46-induced degranulation of dNK cells, whereas co-engagement of NKp44 and NKp46 significantly affected NKp46-induced degranulation of these cells (Fig. 1c,d). Again, treatment with the TGF- β /IL15/IL18 combination maintained NKp46-induced degranulation lower than IL15/IL18-maintained pNK cells (Supplementary Fig. 5b). Together, these data indicate that TGF- β /IL15/IL18-treated pNK cells maintain their capacity to degranulate on NCR engagement to a level comparable to that of dNK cells (Fig. 5b).

To provide further support, we assessed the cytotoxic capacity of TGF- β /IL15/IL18-treated pNK cells using P815 target cells. At an effector to target ratio of 1:1, TGF- β - and TGF- β /IL15/IL18-treated pNK cells did not induce any significant killing on engagement of NKp30 and NKp44 (Fig. 5c). IL15/IL18-treated pNK cells induced modest killing (nearly 20% of specific lysis) on engagement of NKp30 and NKp44 but were able to induce up to 50% of specific lysis on engagement of NKp46. TGF- β /IL15/IL18-treated pNK cells also induced a modest killing on

engagement of NKp46 (Fig. 5c). Similar killing profiles were observed with an effector to target ratio of 25:1 on ligation of NKp30 and NKp44, indicating that TGF- β - and TGF- β /IL15/IL18-treated pNK cells have lower cytotoxic capacity than untreated pNK cells even at the highest ratio (Fig. 5d). By contrast, the engagement of NKp46 induced similar cytotoxic function in both mock-, IL15/IL18- and TGF- β /IL15/IL18-treated pNK cells.

Together these results indicate that decidua-enriched cytokine-treated pNK cells have a reduced cytotoxic capacity that resembles that of dNK cells and further confirm that TGF- β is a critical decidual cytokine for shaping not only the expression of NCRs splice variants but also the dNK cell lytic function.

Decidua-enriched cytokines shape pNK cell secretome. We next compared cytokine secretion by pNK cells that had been maintained under different conditions with that of dNK cells, following NCR ligation using Luminex-multiplexed assay. Medium-maintained pNK cells showed low capacity to produce tumour necrosis factor (TNF)- α , interferon (IFN)- γ , vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, chemokine (C-X-C motif) ligand-8 (CXCL8) and CXCL10 (Fig. 6 and Supplementary Figs 6 and 7) but they produced substantial amounts of chemokine (C-C motif) ligand-4 (CCL4) in response to NKp30 or NKp46 ligation (Supplementary Fig. 7). Only minor changes were observed for CCL3 on engagement of the NKp30 or NKp46 receptors (Fig. 6). The presence of IL15 induced a strong increase in TNF- α , IFN- γ , VEGF-A, CCL3, CCL4 and CXCL8 after NCR ligation but did not affect the basal level of CXCL10 secretion (Supplementary Figs 6 and 7). IL18 alone had a minor effect on cytokine production and IL15/IL18 showed levels similar to IL15

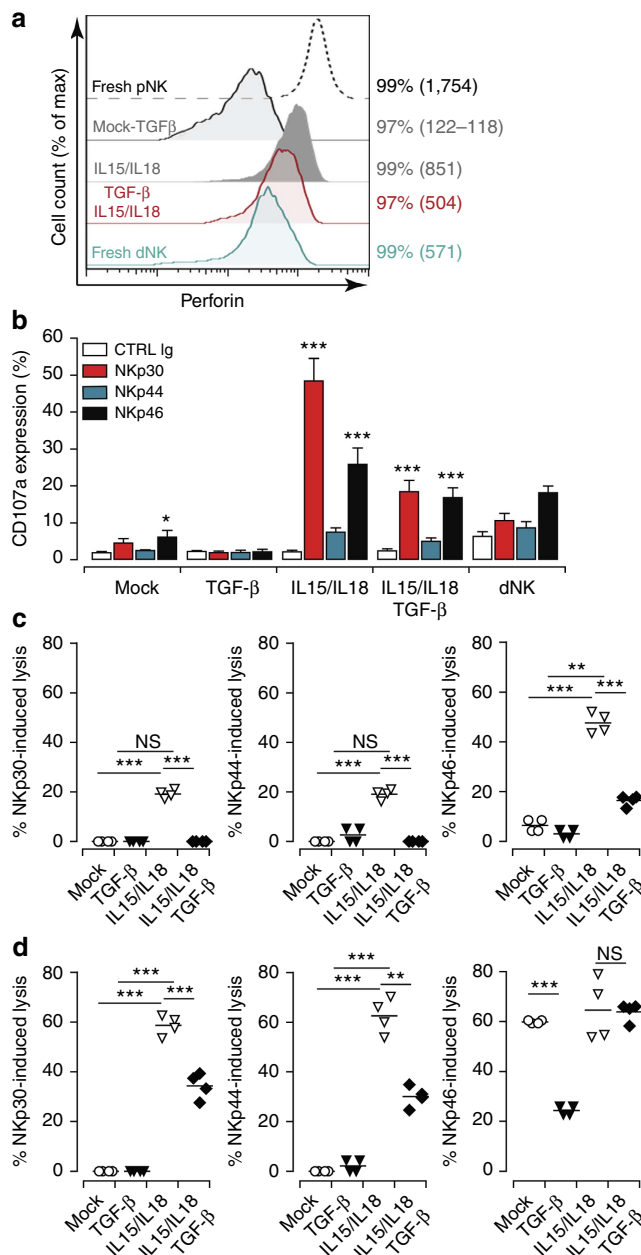


Figure 5 | Decidua-enriched cytokines affect pNK cell cytotoxic function.

(a) The expression of perforin was analysed by flow cytometry in freshly isolated pNK and dNK cells or in pNK cells after 6 days of culture in media alone (Mock) or media supplemented with either TGF-β, IL15/IL18 or the cytokine cocktail (IL15/IL18/TGF-β). The percentage of positive cells and the MFI are given for each marker. (b) CD107a cell surface expression in pNK cells cultured for 6 days and freshly isolated dNK cells after 4 h of NCR ligation. NK cells were stimulated with anti-NKp30, -NKp44, -NKp46 antibodies or isotype-matched controls and chilled on ice. Cellular degranulation (CD107a expression) was then assessed by flow cytometry on CD3^{neg}CD56^{pos} cells. Data on graphs represent mean values ± s.e.m. from six independent donors. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001; NS, not significant; one-way analysis of variance with Bonferroni post test. (c,d) NK cell cytotoxic activity was evaluated in a redirected lysis assay. ⁵¹Cr-labelled P815 cells were incubated with mAbs against the indicated receptor or with an IgG control. Cultured pNK cells were used at the effector:target ratio of 1:1 (c) or 25:1 (d). Data represent mean values ± s.e.m. from at least four independent donors. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001; NS, not significant; one-way analysis of variance with Bonferroni post test.

treatment alone (Supplementary Figs 6 and 7, and Fig. 6). TGF-β alone showed minor effects. Compared with IL15, TGF-β/IL15 or TGF-β/IL15/IL18 treatment strongly decreased the capacity of NKp30 ligation to induce a high amount of TNF-α, IFN-γ and CCL3 but increased the VEGF-A production (Fig. 6 and Supplementary Fig. 6). Similar to NKp30, NKp44 ligation showed a decrease in TNF-α, IFN-γ, CCL3 and CCL4 levels but did not affect the secretion of VEGF-A (Fig. 6 and Supplementary Figs 6 and 7). The addition of TGFβ did not impair NKp46-induced secretion of TNF-α, IFN-γ or CCL3 in IL15-treated pNK cells (Fig. 6). Compared with IL15 treatment, NKp46 ligation resulted in increased VEGF-A production in TGF-β/IL15- and TGF-β/IL15/IL18-treated cells (Fig. 6). None of the cytokines, alone or in combination, was able to induce the secretion of CXCL10, which is highly secreted by dNK cells on NCR ligation (Supplementary Fig. 7).

Overall, and even though the combination of TGF-β/IL15/IL18 does not fully bias the secretion of inflammatory cytokines by pNK cells, it increases VEGF-A secretion while lowering that of TNF-α and IFN-γ in response to NKp30 or NKp44 ligation. This would suggest that the combination of TGF-β/IL15/IL18 results in pNK cells behaving, at least partially, in a similar way to dNK cells. However, TGF-β/IL15/IL18 treatment leads to only minor changes on NKp46 ligation.

Discussion

NCR genes can be transcribed into at least three splice variants^{4,9,10} but the physiological relevance of the different isoforms is yet to be fully depicted. Nevertheless, the NKp44 receptor has an inhibitory function in the plasmacytoid dendritic cells from tonsils, which has been linked to the presence of an intra-cytoplasmic ITIM motif^{11,38}, whereas the NKp30c isoform exerts an immunosuppressive function in cancer¹⁰. Our data reveal that the expression of different NCR splice variants by NK cells delineates functionally distinct subsets and is governed by the cytokine-defined microenvironment. In the context of the dNK cell subset, the differential expression of the NKp30/NCR3 and NKp44/NCR2 isoforms might give them the capacity to contribute to angiogenesis and to trophoblast invasion throughout pregnancy, which to our knowledge, is the first evidence assigning a potential physiological significance to NCR splice variants.

We found that dNK and pNK cell subsets display differential expression patterns for the NKp30/NCR3 and NKp44/NCR2 splice variants. Quantitative RT-PCR analyses revealed a bias of NKp30 and NKp44 isoform expression towards an inhibitory profile in dNK cells compared with pNK cells. This incongruous isoform expression can result in contrasting effector functions following NCR ligation. Although pNK cells are potent cytotoxic effectors and secrete large amounts of pro-inflammatory cytokines, dNK cells are poorly cytotoxic against conventional K562 target cells³¹. In contrast, dNK cells secrete high amounts of soluble factors including cytokines/chemokines and growth factors that are necessary to promote trophoblast invasion and guarantee the correct remodelling of maternal spiral arteries^{13,14}. In support of this, our data demonstrate that NKp30 and NKp44 ligation are unable to trigger proper MTOC relocalization, lytic granule polarization and degranulation in dNK cells, whereas NKp46 ligation has similar effects on both pNK and dNK cells.

These results are in line with our biochemical studies demonstrating differences in NKp30- and NKp44-activated signalling pathways between dNK and pNK cells, whereas no major differences were observed for NKp46-triggered signalling. Although the complete molecular mechanism remain to be further clarified, differences in the activation of signalling

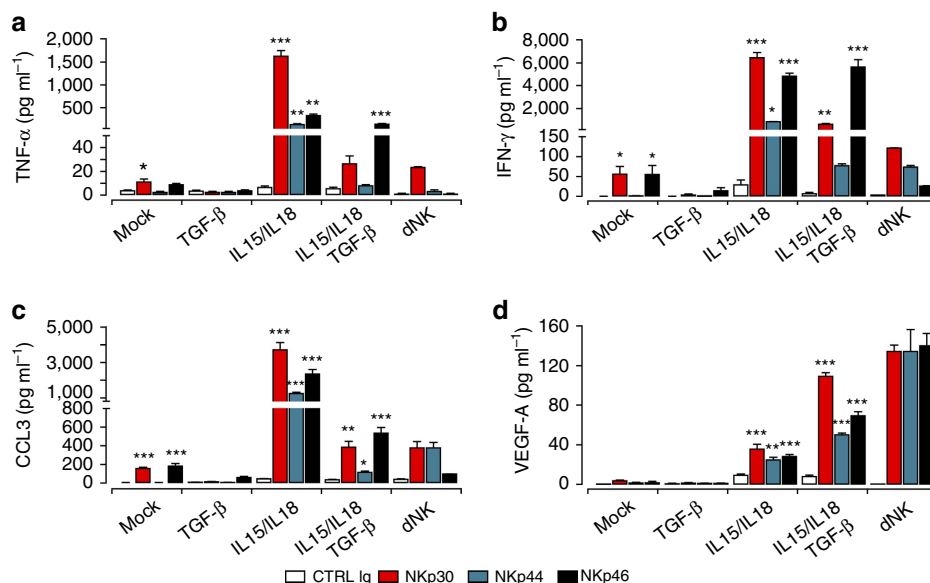


Figure 6 | Decidua-enriched cytokines affect pNK cell cytokine secretion. Levels of secreted TNF-α (a), IFN-γ (b), CCL3 (c) and VEGF-A (d) by pNK cells cultured for 6 days and freshly isolated dNK cells were measured by multiplexed assay after 18 h NKp30, NKp44 or NKp46 ligation. Cells from five independent donors were pelleted and supernatants were collected. Values represent mean values \pm s.e.m.; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; one-way analysis of variance with Bonferroni post test.

pathways can result in the differential recruitment of adaptor proteins or in the recruitment of different adaptors as has been shown for other NKR³⁹. This notion is supported by pioneering work on NKp30, which demonstrated a differential recruitment of the ITAM-bearing adaptor molecule CD3 ζ by different isoforms¹⁰. Differences in phosphorylation and activation of signalling pathways downstream of these receptors might be part of a negative feedback loop to control receptor-induced activation. Such a scenario could apply to the NKp44 receptor, as two of its isoforms contain ITIM motifs that transmit strong inhibitory signals, which can counteract activating signals emanating from the NKp46 receptor.

Immune cells in the uterine mucosa contribute a great deal to the outcome of pregnancy²⁶. dNK cell behaviour is tightly regulated through different pathways, including local activating/inhibitory signals provided by the fetal trophoblast, cytokine production by the mucosal stroma and autocrine inhibition via the dNK cell's own production of cytokines. In this study, we reveal that a TGF-β/IL15/IL18 cocktail is sufficient to increase the expression of the NKp30c and NKp44c inhibitory isoforms, and to convey a decidua-like phenotype to pNK cells that is marked by increased levels of CD56 and the *de novo* acquisition of the dNK cell-specific markers CD9, CD49a and CD103, as well as CD69 and the NKp44 receptor. Our results not only demonstrate the key role of soluble factors in controlling the expression of NCR splice variants in NK cells but also underscore the fact that soluble factors present within the decidua could alter the alternative splicing of NCRs, to promote a state of tolerance.

Unlike dNK cells that are widely CD16^{neg}, we found that CD16 expression was not impaired in TGF-β/IL15/IL18-maintained pNK cells. In addition, the TGF-β/IL15/IL18 cocktail did not impair NK cell cytotoxicity after NKp46 ligation, yet it downmodulated NKp30- and NKp44-induced degranulation. Furthermore, it biased cytokine-induced secretion towards a decidua profile with decreased TNF-α and IFN-γ production, and the induction of VEGF-A secretion. However, it must be noted that we cannot exclude the involvement of other factors that could also promote fetal tolerance. For example, immunosuppressive factors

such as the indoleamine 2,3-dioxygenase, IL10 or hypoxia^{40–42} also ensure the maintenance of a decidua phenotype and promote fetal tolerance. This study did not tackle this aspect, but it has been shown that dNK cells establish a sustained contact with semi-allogeneic fetal-derived trophoblasts that express only NKp30 and NKp44 ligands even if they express only low amounts of classical major histocompatibility complex-I molecules¹⁴. It is likely to be that sustained engagement of the NKp30 and NKp44 receptors will not only stimulate dNK cell soluble factor's secretion that is essential for a healthy pregnancy but also prevent cytotoxicity. Thus, NKp30 and NKp44 are probably key receptors orchestrating the maintenance of the dNK phenotype.

NCRs strongly activate NK cell cytotoxicity against cancer and various pathogens including HIV-1, influenza, hepatitis viruses and *Plasmodium falciparum*^{43–45}. Viruses and cancers have great capacities for hijacking their local environment and escaping NCR pressure^{46–49}. Sophisticated immune evasion mechanisms are usually associated with the loss of NCR function and dampening of cell surface major histocompatibility complex-I. However, it is unclear whether changes in the local environment could regulate the alternative splicing of NCRs. Our data clearly demonstrate that modification of the cytokine milieu can favour the expression of inhibitory rather than activating isoforms and probably dampen NK cell responsiveness. Hence, a default/exacerbation of NK cell effector functions could very well be governed by the local microenvironment to change the balance of dominant receptor isoform expression⁵⁰. In such scenario, restoring an appropriate NCR isoforms ratio might re-establish NK cell effector functions.

Differences in the pNK and dNK cell immune responses are well recognized. Even though such discrepancies are probably due to the engagement of the different receptors or differential expression of the same receptor as in cancer patients¹⁰, little knowledge, if any, has been gained within a healthy setting. In the present study, and in accordance with our published report¹³, we show that the same NCR triggers different functions in dNK and pNK cell populations through the differential expression of receptor isoforms.

Pregnancy disorders are often associated with defaults in artery remodelling that can be attributed to defective dNK cells. Microenvironment bias with a shift from pro-Th2 cytokines towards pro-Th1 cytokines has been implicated in some of these disorders⁵¹. For example, alterations of IL15, IL18 and TGF- β levels have been reported in patients with pre-eclampsia, a common pregnancy disorder^{52–54}. It is therefore tempting to speculate that alterations in the levels of immunosuppressive and/or immunostimulatory cytokines could influence NCR transcript ratios and participate in the aetiology of the disorder.

Besides providing the first evidence assigning a potential biological/physiological relevance to NCR splice variants, our results propose a new model of the regulation of NK cell functions based on the expression of the NKp30/NCR3 and NKp44/NCR2 isoforms. We also provide evidence of the relevance of cytokines present in the pregnant uterus as a trigger for NK cell responsiveness through the regulation of alternative splicing of the NCRs. Thus, the specific adaptation of NKR expression dictates the appropriate responses, in the same manner to that the role of the local microenvironment is proposed to play a role in generating NK cell memory^{55,56}. Overall, this study demonstrates the molecular differences of NK cell subsets and defines a unique perspective that cytokines enriched in the mucosal microenvironment maintain the decidual phenotype of dNK cells. Whether this would apply to other immune cells remains an open question. Beyond the still lacking knowledge concerning the expression of natural NKp46 ligand, the fact that semi-allogeneic trophoblasts express only NKp30 and NKp44 ligands reinforces the above notion.

Methods

Ethics statement. The study has been approved by the local Research Ethical Committee and the National Biomedicine Agency (PFS08-022). All patients gave their signed informed consents according to the Declaration of Helsinki before sample collection.

Cell purification. First-trimester decidua basalis (at 8–12 weeks of pregnancy) and blood-matched samples were obtained from healthy women undergoing vaginal elective termination of pregnancy (a cohort of ten donors and age range 18–30 years) as previously described^{13,16}. Briefly, decidua basalis was isolated from elective pregnancy termination samples (8–12 week of pregnancy), minced and digested with collagenase IV (Sigma-Aldrich, France) for 60 min at 37 °C under gentle stirring. The resulting cellular mixture was filtered, separated over Ficoll-Hypaque density gradient (Amersham Biotech). Cells were washed and allowed to adhere to tissue culture plate overnight at 37 °C in tissue culture medium (RPMI 1640/GlutaMAX, Gibco) supplemented with 10% FCS. dNK cells were purified from the non-adherent cell fraction using MACS negative selection kits (Miltenyi Biotec, France). Usually, dNK cells represent 50% of the non-adherent cell fraction but this number varies with the quality and the size of the tissue ($2\text{--}8 \times 10^6$ dNK cells per decidua). pNK cells were isolated from paired peripheral blood samples (pregnancy samples) or healthy volunteer blood donors. More than 98% of purified cells were CD3^{neg}CD56^{pos}. In some experiments, NKp44 cell surface expression on freshly isolated pNK cells was induced by overnight culture in the presence of IL15 (10 ng ml^{-1}).

Quantitative RT-PCR. Total cellular RNA was isolated from dNK or pNK cells using an RNeasy kit (Qiagen, France). First-strand complementary DNA was synthesized from 1 μg total RNA using SuperScript III reverse transcriptase and random primers, according to the manufacturer's protocol (Life Technologies, France). PCR primers for NCR3 (ref. 10), NCR2 and the β -actin housekeeping transcripts were designed using an NCBI primer blast and their positions are indicated in Supplementary Fig. 1a and Table 1. The quantitative RT-PCR data were determined and normalized to the *actin* housekeeping gene according to the standard $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.

Antibodies and reagents. Fluorochrome-conjugated anti-human monoclonal antibodies were used. Anti-CD56 (allophycocyanin, 1:50 dilution, BD Pharmingen), anti-CD3 (phycoerythrin-Cy7, 1:100 dilution, BD Pharmingen), anti-CD16 (phycoerythrin, 1:100 dilution, BD Pharmingen), anti-CD69 (fluorescein isothiocyanate, 1:50 dilution, BD Pharmingen), anti-NKG2D/CD314 (phycoerythrin, 1:50 dilution, BD Pharmingen), anti-NKp30/CD337 (phycoerythrin, 1:50 dilution,

BD Pharmingen), anti-NKp44/CD336 (phycoerythrin, 1:50 dilution, BD Pharmingen), anti-NKp46/CD335 (phycoerythrin, 1:50 dilution, BD Pharmingen), anti-CD9 (phycoerythrin, 1:50 dilution BD Pharmingen), anti-CD49a (phycoerythrin, 1:50 dilution, BD Pharmingen), anti-CD103 (fluorescein isothiocyanate, 1:50 dilution, BD Pharmingen), anti-CD107a (phycoerythrin, 1:50 dilution, BD Pharmingen), anti-NKG2C/CD159c (phycoerythrin, 1:50 dilution, R&D Systems), anti-CXCR3 (PerCP/Cy5.5, 1:50 dilution, Biolegend), anti-CXCR4 (phycoerythrin, 1:50 dilution, Biolegend), anti-human perforin (phycoerythrin, 1:50 dilution, eBioscience) and isotype-matched controls (1:100 dilution, BD Pharmingen). Recombinant human IL15, IL18 and TGF- β (Tebu-bio, France) were used at a final concentration of 10 ng ml^{-1} for IL15 and IL18, and 2.5 ng ml^{-1} for TGF- β . Phorbol myristate acetate, a protein kinase C activator, and ionomycin, a Ca^{2+} ionophore, were obtained from Sigma-Aldrich and used at a final concentration of 2 ng ml^{-1} and $1 \mu\text{g ml}^{-1}$, respectively.

Immunostaining and cytometry analysis. After stimulation, cells were washed in PBS and immunostaining was carried out at 4 °C using fluochrome-coupled monoclonal antibodies diluted in FACS buffer (PBS, 1% BSA). Intracellular staining was performed on fixed cells using the BD Cytofix/Cytoperm buffer (BD Bioscience, France). Analyses were performed on a BD FACS Calibur cytometer with the acquisition of at least 5×10^4 events. Data were further analysed using FlowJo software 7.6.5. FACS plots were obtained by applying a gate on CD3^{neg}CD56^{pos} cells. Expression of a given marker is presented as the percentage of positive cells and as the geometric MFI.

Degranulation assay. For degranulation assay, NK cells were stimulated through receptor ligation using antibody-coated tissue culture plates ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$). After 4 h, the reaction was stopped by reducing the temperature to 4 °C. Cells were stained with fluorochrome-conjugated anti-human CD107a or isotype-matched control, then analysed by flow cytometry.

Confocal microscopy. NK cells were stimulated for 20 min on anti-NKp30-, anti-NKp44-, anti-NKp46- or anti-NKG2A-coated glass coverslips. Cells were then paraformaldehyde fixed and stained with anti-perforin and anti-tubulin antibodies as previously described^{13,16}. Briefly, filamentous actin cytoskeletons were visualized with AlexaFluor-conjugated phalloidin and nuclei were stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole. ISs were analysed using a Zeiss LSM710 confocal microscope (Carl Zeiss, Germany). Images were processed using ImageJ software.

Redirected killing assay. P815 mastocytoma (ATCC, TIB-64) were used as NK cell targets at an effector to target ratio of 1:1 and 25:1. Target cells (5×10^3 cells) were labelled with $100 \mu\text{Ci}$ of ^{51}Cr (sodium chromate, 1 mCi ml^{-1} ; Perkin Elmer, Courtabouef, France) as described¹⁶. Briefly, ^{51}Cr -labelled target cells were incubated for 20 min on ice with specific monoclonal antibodies or isotype-matched controls at a final concentration of $10 \mu\text{g ml}^{-1}$, then included as targets in NK-cell cytotoxicity assay. After 4 h of co-culture, radioactivity was quantified in cell-free supernatants using LumaPlate and a TopCount (Perkin Elmer). Specific cytotoxicity was calculated as a percentage using the formula $(100 \times [\text{Sample mean (cpm)} - \text{spontaneous mean (cpm)}] / [\text{maximum mean (cpm)} - \text{spontaneous mean (cpm)}])$. Spontaneous release was obtained from ^{51}Cr -labelled target cells cultured alone. Maximum lysis was obtained from cells cultured in 1% Triton X-100.

NK-cell phenotype. pNK cells were cultured in the presence of the indicated cytokines (2.5 ng ml^{-1} of TGF- β and 10 ng ml^{-1} of IL15 or IL18) for 6 days. Culture media were replaced every 72 h and fresh cytokines were added. Cells were immunostained with fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies.

Multiplex cytokine and chemokine array. pNK cells were cultured in the presence of the indicated cytokines (2.5 ng ml^{-1} of TGF- β and 10 ng ml^{-1} of IL15 or IL18) for 6 days. Cultured pNK or freshly isolated dNK cells were stimulated through NCR ligation for 18 h. All experiments were performed using the same number of cells plated overnight. Cytokine, chemokine and growth factor levels were measured in culture supernatants using 7-multiplexed Affymetrix cytokine assay (TNF- α , IFN- γ , VEGF-A, CXCL8/IL-8, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β and CXCL10/IP-10) according to the manufacturer's procedures (Procarta/eBioscience, France).

Statistical analysis. Statistical analyses were performed using Student's *t*-test or Mann-Whitney test for non-paired groups, paired Student's *t*-test for paired groups and one-way analysis of variance with Bonferroni post test for multiple comparison (GraphPadPrism Software). Data are expressed as mean value \pm s.e.m. *P*-values < 0.05 were considered significant. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001.

References

- Hudspeth, K., Silva-Santos, B. & Mavilio, D. Natural cytotoxicity receptors: broader expression patterns and functions in innate and adaptive immune cells. *Front. Immunol.* **4**, 69 (2013).
- Lanier, L. L. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat. Immunol.* **9**, 495–502 (2008).
- Moretta, A., Locatelli, F. & Moretta, L. Human NK cells: from HLA class I-specific killer Ig-like receptors to the therapy of acute leukemias. *Immunol. Rev.* **224**, 58–69 (2008).
- Cantoni, C. *et al.* NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. *J. Exp. Med.* **189**, 787–796 (1999).
- Sivori, S. *et al.* p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J. Exp. Med.* **186**, 1129–1136 (1997).
- Vitale, M. *et al.* NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J. Exp. Med.* **187**, 2065–2072 (1998).
- Pende, D. *et al.* Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J. Exp. Med.* **190**, 1505–1516 (1999).
- Pessino, A. *et al.* Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J. Exp. Med.* **188**, 953–960 (1998).
- Hollyoake, M., Campbell, R. D. & Aguado, B. NKp30 (NCR3) is a pseudogene in 12 inbred and wild mouse strains, but an expressed gene in *Mus caroli*. *Mol. Biol. Evol.* **22**, 1661–1672 (2005).
- Delahaye, N. F. *et al.* Alternatively spliced NKp30 isoforms affect the prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Nat. Med.* **17**, 700–707 (2011).
- Fuchs, A., Cella, M., Kondo, T. & Colonna, M. Paradoxical inhibition of human natural interferon-producing cells by the activating receptor NKp44. *Blood* **106**, 2076–2082 (2005).
- Apps, R., Gardner, L., Traherne, J., Male, V. & Moffett, A. Natural-killer cell ligands at the maternal-fetal interface: UL-16 binding proteins, MHC class-I chain related molecules, HLA-F and CD48. *Hum. Reprod. (Oxford, England)* **23**, 2535–2548 (2008).
- El Costa, H. *et al.* Critical and differential roles of NKp46- and NKp30-activating receptors expressed by uterine NK cells in early pregnancy. *J. Immunol.* **181**, 3009–3017 (2008).
- Hanna, J. *et al.* Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat. Med.* **12**, 1065–1074 (2006).
- Jabrane-Ferrat, N. & Siewiera, J. The up side of decidual natural killer cells: new developments in immunology of pregnancy. *Immunology* **141**, 490–497 (2014).
- Siewiera, J. *et al.* Human cytomegalovirus infection elicits new decidual natural killer cell effector functions. *PLoS Pathog.* **9**, e1003257 (2013).
- Vacca, P. *et al.* Regulatory role of NKp44, NKp46, DNAM-1 and NKG2D receptors in the interaction between NK cells and trophoblast cells. Evidence for divergent functional profiles of decidual versus peripheral NK cells. *Int. Immunol.* **20**, 1395–1405 (2008).
- Hanna, J. *et al.* CXCL12 expression by invasive trophoblasts induces the specific migration of CD16- human natural killer cells. *Blood* **102**, 1569–1577 (2003).
- Manaster, I. *et al.* Endometrial NK cells are special immature cells that await pregnancy. *J. Immunol.* **181**, 1869–1876 (2008).
- Vacca, P. *et al.* CD34+ hematopoietic precursors are present in human decidua and differentiate into natural killer cells upon interaction with stromal cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **108**, 2402–2407 (2011).
- Kitaya, K., Nakayama, T., Daikoku, N., Fushiki, S. & Honjo, H. Spatial and temporal expression of ligands for CXCR3 and CXCR4 in human endometrium. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 2470–2476 (2004).
- Kitaya, K., Yasuda, J., Nakayama, T., Fushiki, S. & Honjo, H. Effect of female sex steroids on human endometrial CD16neg CD56bright natural killer cells. *Fertil. Steril.* **79**(Suppl 1): 730–734 (2003).
- Sentman, C. L., Meadows, S. K., Wira, C. R. & Eriksson, M. Recruitment of uterine NK cells: induction of CXC chemokine ligands 10 and 11 in human endometrium by estradiol and progesterone. *J. Immunol. (Baltimore, MD)* **173**, 6760–6766 (2004).
- Ashkar, A. A. & Croy, B. A. Functions of uterine natural killer cells are mediated by interferon gamma production during murine pregnancy. *Semin. Immunol.* **13**, 235–241 (2001).
- Ashkar, A. A., Di Santo, J. P. & Croy, B. A. Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. *J. Exp. Med.* **192**, 259–270 (2000).
- Moffett, A. & Loke, C. Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nat. Rev.* **6**, 584–594 (2006).
- Koopman, L. A. *et al.* Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J. Exp. Med.* **198**, 1201–1212 (2003).
- Das, R. & Tripathy, A. Increased expressions of NKp44, NKp46 on NK/NKT-like cells are associated with impaired cytolytic function in self-limiting hepatitis E infection. *Med. Microbiol. Immunol.* **203**, 303–314 (2014).
- Sivori, S. *et al.* Involvement of natural cytotoxicity receptors in human natural killer cell-mediated lysis of neuroblastoma and glioblastoma cell lines. *J. Neuroimmunol.* **107**, 220–225 (2000).
- Wang, H., Zheng, X., Wei, H., Tian, Z. & Sun, R. Important role for NKp30 in synapse formation and activation of NK cells. *Immunol. Invest.* **41**, 367–381 (2012).
- Kopcow, H. D. *et al.* Human decidual NK cells form immature activating synapses and are not cytotoxic. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 15563–15568 (2005).
- Brown, A. C. *et al.* Remodelling of cortical actin where lytic granules dock at natural killer cell immune synapses revealed by super-resolution microscopy. *PLoS Biol.* **9**, e1001152 (2011).
- Graham, C. H., Lysiak, J. J., McCrae, K. R. & Lala, P. K. Localization of transforming growth factor-beta at the human fetal-maternal interface: role in trophoblast growth and differentiation. *Biol. Reprod.* **46**, 561–572 (1992).
- Kitaya, K. *et al.* IL-15 expression at human endometrium and decidua. *Biol. Reprod.* **63**, 683–687 (2000).
- Tokmadzic, V. S. *et al.* IL-18 is present at the maternal-fetal interface and enhances cytotoxic activity of decidual lymphocytes. *Am. J. Reprod. Immunol.* **48**, 191–200 (2002).
- Keskin, D. B. *et al.* TGFbeta promotes conversion of CD16+ peripheral blood NK cells into CD16- NK cells with similarities to decidual NK cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104**, 3378–3383 (2007).
- Kunkel, E. J. *et al.* Expression of the chemokine receptors CCR4, CCR5, and CXCR3 by human tissue-infiltrating lymphocytes. *Am. J. Pathol.* **160**, 347–355 (2002).
- Campbell, K. S., Yusa, S., Kikuchi-Maki, A. & Catina, T. L. NKp44 triggers NK cell activation through DAP12 association that is not influenced by a putative cytoplasmic inhibitory sequence. *J. Immunol.* **172**, 899–906 (2004).
- Perez-Quintero, L. A. *et al.* EAT-2, a SAP-like adaptor, controls NK cell activation through phospholipase Cgamma, Ca++ and Erk, leading to granule polarization. *J. Exp. Med.* **211**, 727–742 (2014).
- Cerdeira, A. S. *et al.* Conversion of peripheral blood NK cells to a decidual NK-like phenotype by a cocktail of defined factors. *J. Immunol.* **190**, 3939–3948 (2013).
- Durr, S. & Kindler, V. Implication of indolamine 2,3 dioxygenase in the tolerance toward fetuses, tumors, and allografts. *J. Leukoc. Biol.* **93**, 681–687 (2013).
- Renaud, S. J., Macdonald-Goodfellow, S. K. & Graham, C. H. Coordinated regulation of human trophoblast invasiveness by macrophages and interleukin 10. *Biol. Reprod.* **76**, 448–454 (2007).
- Mandelboim, O. *et al.* Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* **409**, 1055–1060 (2001).
- Mavoungou, E., Held, J., Mewono, L. & Kremsner, P. G. A Duffy binding-like domain is involved in the NKp30-mediated recognition of *Plasmodium falciparum*-parasitized erythrocytes by natural killer cells. *J. Infect. Dis.* **195**, 1521–1531 (2007).
- Vieillard, V., Strominger, J. L. & Debre, P. NK cytotoxicity against CD4+ T cells during HIV-1 infection: a gp41 peptide induces the expression of an NKp44 ligand. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 10981–10986 (2005).
- Holder, K. A., Stapleton, S. N., Gallant, M. E., Russell, R. S. & Grant, M. D. Hepatitis C virus-infected cells downregulate NKp30 and inhibit ex vivo NK cell functions. *J. Immunol.* **191**, 3308–3318 (2013).
- Donatelli, S. S. *et al.* TGF-beta-inducible microRNA-183 silences tumor-associated natural killer cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **111**, 4203–4208 (2014).
- Arnon, T. I. *et al.* Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat. Immunol.* **6**, 515–523 (2005).
- Furman, M. H., Dey, N., Tortorella, D. & Ploegh, H. L. The human cytomegalovirus US10 gene product delays trafficking of major histocompatibility complex class I molecules. *J. Virol.* **76**, 11753–11756 (2002).
- Laprevotte, E. *et al.* Recombinant human IL-15 trans-presentation by B leukemic cells from chronic lymphocytic leukemia induces autologous NK cell proliferation leading to improved anti-CD20 immunotherapy. *J. Immunol.* **191**, 3634–3640 (2013).
- Sargent, I. L., Borzychowski, A. M. & Redman, C. W. NK cells and human pregnancy—an inflammatory view. *Trends Immunol.* **27**, 399–404 (2006).
- Hu, W., Wang, H., Wang, Z., Huang, H. & Dong, M. Elevated serum levels of interleukin-15 and interleukin-16 in preeclampsia. *J. Reprod. Immunol.* **73**, 166–171 (2007).
- Peracoli, M. T. *et al.* Platelet aggregation and TGF-beta(1) plasma levels in pregnant women with preeclampsia. *J. Reprod. Immunol.* **79**, 79–84 (2008).
- Pugliese, A., Beltramo, T., Todros, T., Cardaropoli, S. & Ponzetto, A. Interleukin-18 and gestosis: correlation with *Helicobacter pylori* seropositivity. *Cell. Biochem. Funct.* **26**, 817–819 (2008).

55. Cooper, M. A. *et al.* Cytokine-induced memory-like natural killer cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**, 1915–1919 (2009).
56. Lopez-Verges, S. *et al.* Expansion of a unique CD57(+)NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **108**, 14725–14732 (2011).

Acknowledgements

We thank C. Davrinche (CPTP) and J. Izopet (CHU-Toulouse) for their valuable input; A. Erlebacher (NYU), D. Charron (Paris VII) and L. Ferrat (Toulouse) for critical reading and comments on the manuscript; and S. Arabi for help with iconography. We also thank the MDs from the Paule de Viguier and Sarrus-Teinturiers hospitals for participating in the study and collecting the clinical material. We are grateful for the help from the CPTP Cell Imaging and Flow Cytometry core facilities. This work was supported by the INSERM, the CNRS (N.J.F.), the Fondation pour la Recherche Médicale (FDT20130928395) (J.S.) and the 'Ministère de la Recherche' of France (H.H.). English language proofreading was performed by Scientific Scripts (<http://scientificscripts.com>).

Author contributions

J.S. participated in the design, conducted research experiments, analysed the data, performed statistical analyses and drafted the manuscript. J.G. and H.H. performed experiments and helped in data analyses. G.C. and C.L. provided clinical material necessary for the study. R.A.-D. gave critical feedback, drafted and wrote the

manuscript. N.J.F. conceived, designed and supervised the work and wrote the manuscript.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

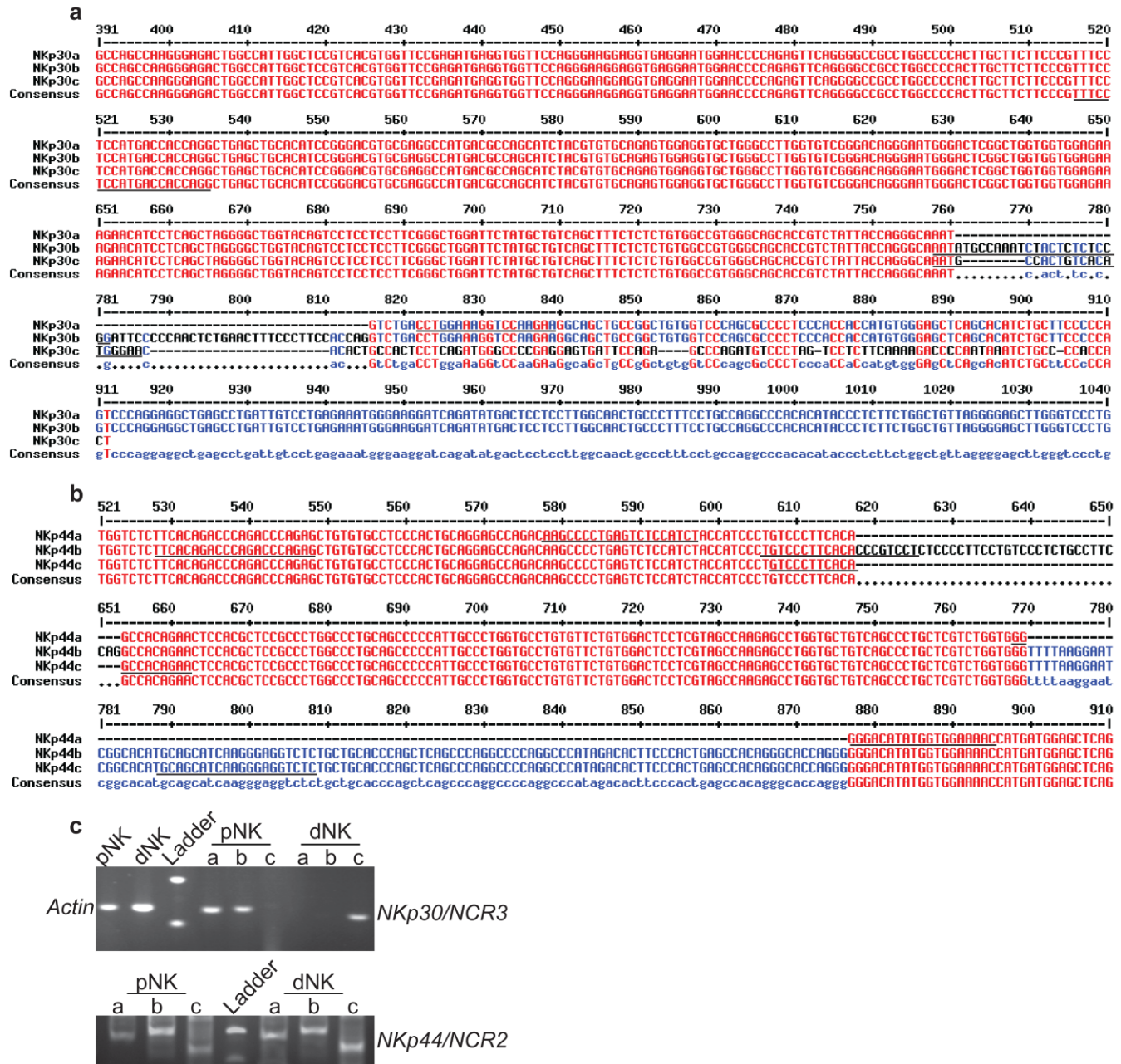
Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

How to cite this article: Siewiera, J. *et al.* Natural cytotoxicity receptor splice variants orchestrate the distinct functions of human natural killer cell subtypes. *Nat. Commun.* 6:10183 doi: 10.1038/ncomms10183 (2015).



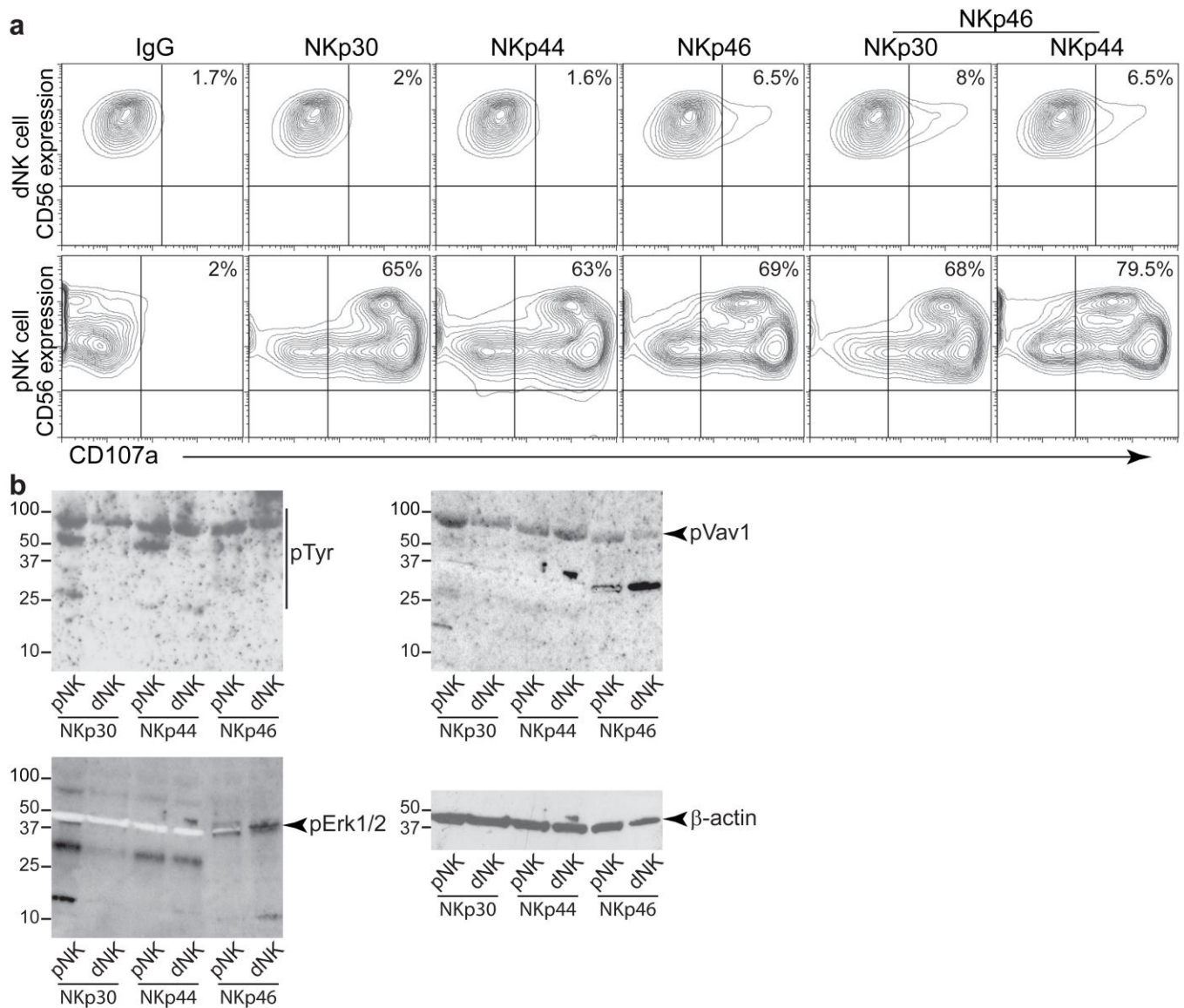
This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Supplementary Figures



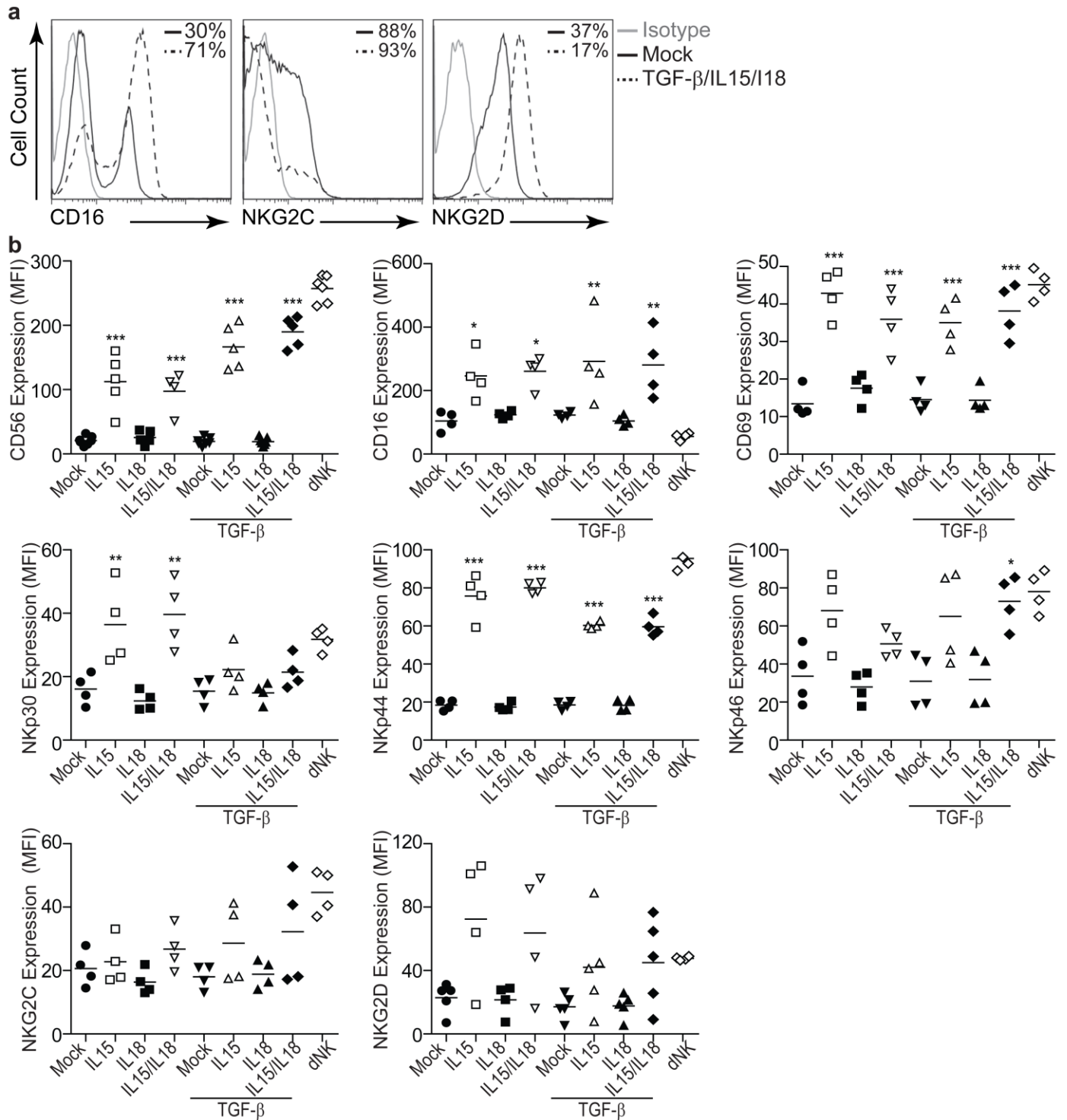
Supplementary Figure 1.

Sequence alignments of NCR splice variants. Multiple alignments of NCR splice variant coding sequence of the (a) NKp30/NCR3 splice variant a (NM_147130.2), splice variant b (NM_001145466.1) and splice variant c (NM_001145467.1), and the (b) NKp44/NCR2 splice variant a (NM_001199510), splice variant b (NM_001199509.1) and splice variant c (NM_004828.3). Conserved residues are depicted in red. Black indicates insertion and or deletions that are specific for a single splice variant. Blue indicates insertions that are common to two splice variants. Deduced consensus sequence are shown in blue lower-case lettering. Forward and reverse primer sequences are underlined with solid horizontal lines. Numbers above each sequence sets indicate nucleotide position on full length mRNA. Residues conserved in all the aligned sequences are represented by asterisks, while partially conserved residues are marked in blue letters. (c) mRNA were extracted from freshly-isolated dNK and pNK cells from the same donor. mRNA expression of the *actin* housekeeping gene, *NKp30/NCR3* and *NKp44/NCR2* splice variants was determined by RT-PCR analysis. *Actin* and *NKp30/NCR3* PCR fragments were separated by electrophoresis using a 2% agarose gel. *NKp30/NCR3* PCR fragments were separated using a 8% native polyacrylamide gel.



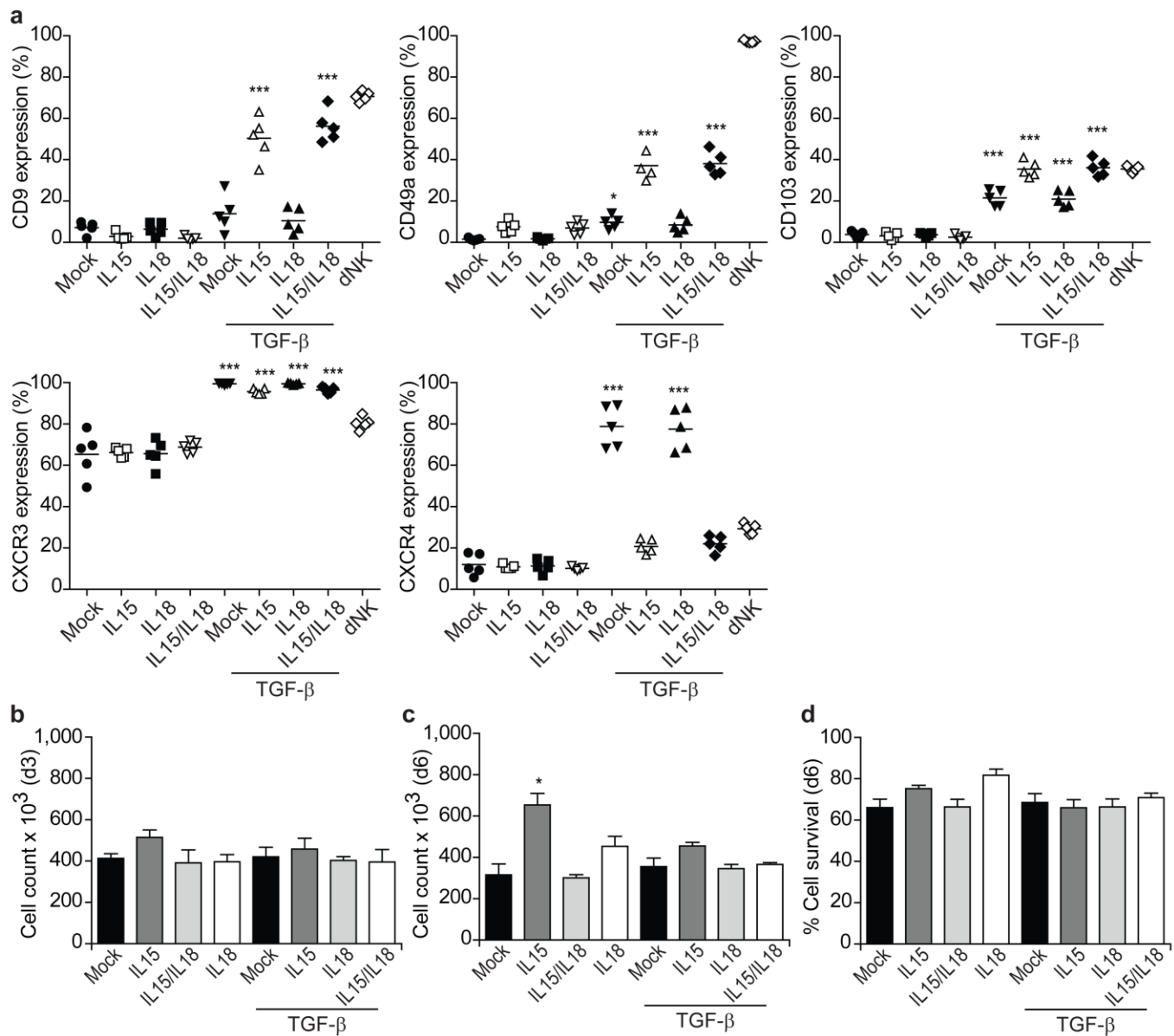
Supplementary Figure 2.

Differential expression of NCR isoforms by dNK cells and pNK cells results in differential activation upon receptor cross-linking. (a) Freshly-isolated dNK and pNK cells cultured overnight with IL15 (10 ng ml^{-1}) were stimulated for 4 hours with a single or combination of two specific mAbs. All the reactions were carried in the presence of fluorochrome-conjugated anti-CD107a mAb and monensin. CD107a expression was analysed by flow cytometry on $\text{CD3}^{\text{neg}}\text{CD56}^{\text{pos}}$ cells. Representative FACS plots from three independent donors are shown. (b) Differential effect of specific receptor ligation on cell signalling. dNK or overnight IL15-cultured pNK cells were stimulated for 20min with anti-NKp30, -NKp44 and -NKp46 antibodies. Cleared cell lysates ($10 \mu\text{g}$ of total cellular proteins) were separated by 4–15% denaturing-gradient gel and electrotransferred. Proteins were successively immunoblotted with the indicated Ab or with anti- β -actin Ab to verify protein loading. Black arrow heads indicate the protein of interest.



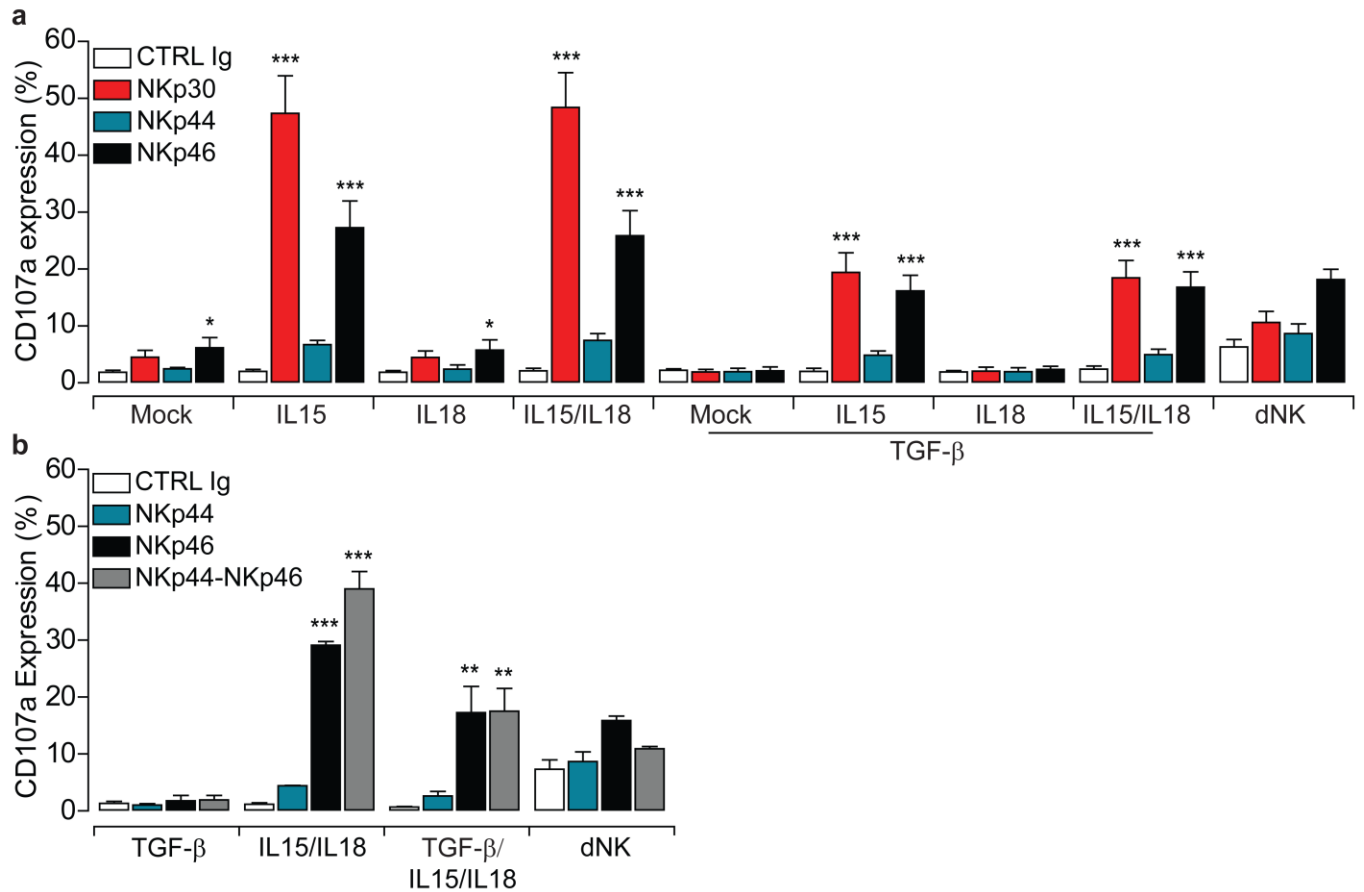
Supplementary Figure 3.

Modulation of NK cell receptor expression by Cytokines enriched in the decidual environment. (a) Flow cytometry analysis showing a representative CD3^{neg}CD56^{pos} NK cell expression of CD16, NKG2D or NKG2A after 6 days of culture with different cytokine combinations. Isotype matched control (grey), pNK cells cultured in complete media (continuous black) and pNK cells cultured in media supplemented with cytokine cocktail (dashed black). The percentage of positive cells is given for each condition. (b) Graphs represent Mean Fluorescence Intensity (MFI) of pNK cells after 6 days of culture with or without cytokines and freshly-isolated dNK cells. Data on graphs represent mean values \pm s.e.m. from at least 4 independent donors. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns: not significant, one-way analysis of variance with Bonferroni post-test.



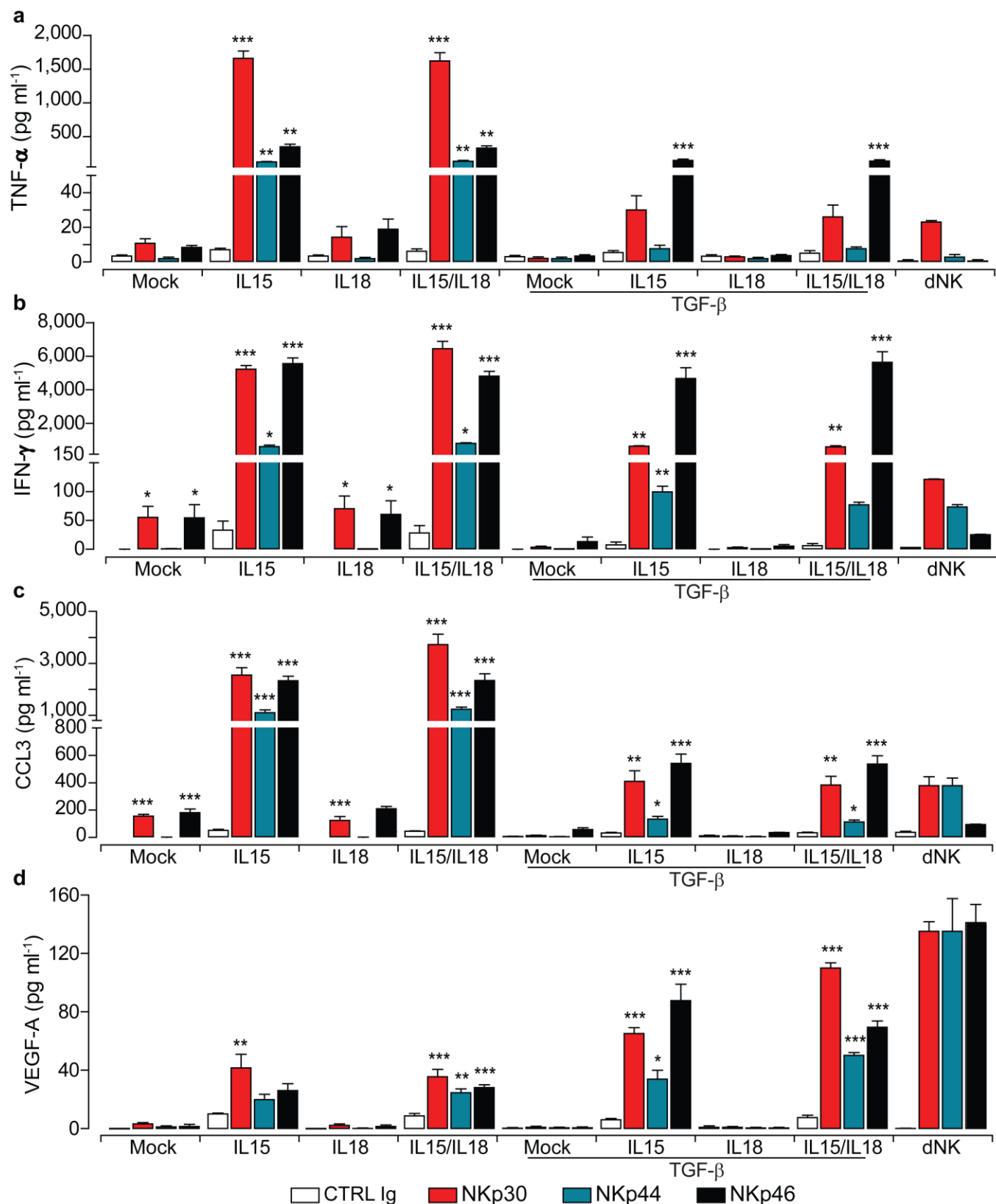
Supplementary Figure 4.

Cytokine treatment induces the acquisition of specific dNK cell markers with no impairment of pNK cell proliferation. The expression of dNK cell specific markers was analysed by flow cytometry in freshly isolated dNK cells and in pNK cells after 6 days of culture in media supplemented or not with different cytokine combinations. Data on graphs represent the percentage of positive cells for a dNK cell specific marker (CD9, CD49a, CD103) and two chemokine receptors that are differentially expressed in the two NK cell subsets (CXCR3 and CXCR4). The percentage of positive cells is given for each marker. Data represent mean values \pm s.e.m. from at least 4 independent donors. *** $p < 0.001$, one-way analysis of variance with Bonferroni post-test. **(b,c,d)** The impact of cytokines on pNK cell proliferation and survival were monitored by counting cells on hemocytometer before the analysis of PI positive cells by flow cytometry. Cell number after 3 days of culture **(b)**, 6 days **(c)**, the percentage of cell survival after 6 days of culture **(d)**. Each data point represents mean values \pm s.e.m. from 4 independent donors performed in triplicates, one-way analysis of variance with Bonferroni post-test.



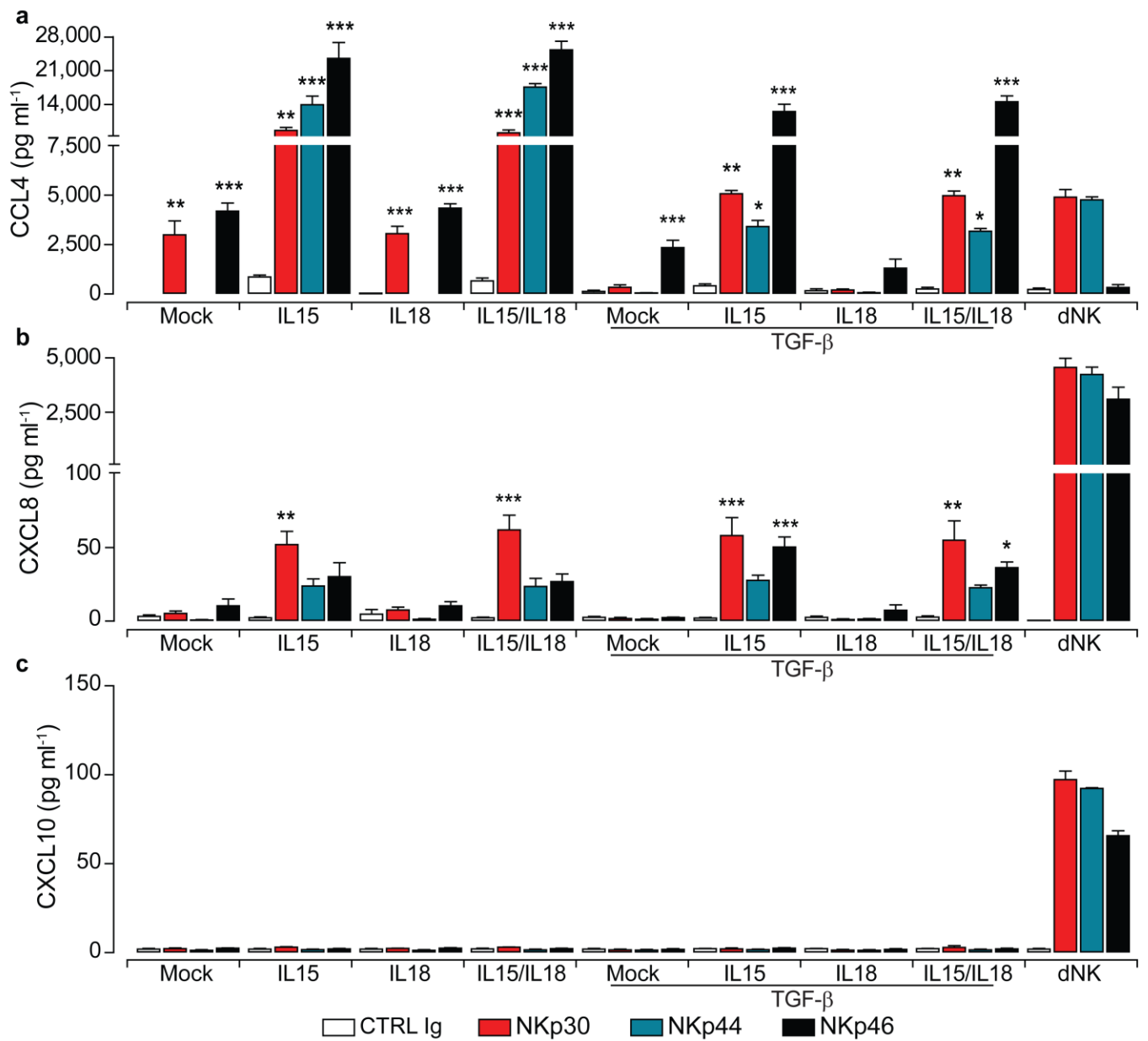
Supplementary Figure 5.

Decidual cytokines affect pNK cell degranulation. (a) CD107a cell surface expression in pNK cells cultured for 6 days and freshly-isolated dNK cells after 4 hours of NCR ligation. NK cells stimulated with anti-NKp30, -NKp44, -NKp46 antibodies or Isotype matched controls and chilled on ice. Cellular degranulation (CD107a expression) was then assessed by flow cytometry on CD3^{neg}CD56^{pos} cells. Representative graphs of 6 independent donors are presented. (b) Degranulation was evaluated after engagement of NKp46, NKp44 alone or co-engagement of both receptors on cytokine treated cells. Data represent mean values \pm s.e.m. from at least 4 independent donors. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, one-way analysis of variance with Bonferroni post-test.



Supplementary Figure 6.

Decidual cytokines affect pNK cell cytokine secretion. Levels of secreted TNF- α (a), IFN- γ (b), CCL3 (c) and VEGF-A (d) by pNK cells cultured for 6 days and freshly-isolated dNK cells were measured by multiplexed assay after 18 hours NKp30, NKp44 or NKp46 ligation. Cells from 5 independent donors were pelleted and supernatants were collected. Values represent mean values \pm s.e.m. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, one-way analysis of variance with Bonferroni post-test.



Supplementary Figure 7.

Decidual cytokines affect pNK cell cytokine secretion. Levels of secreted CCL4 (a), CXCL8 (b), CXCL10 (c) by pNK cells cultured for 6 days and freshly-isolated dNK cells were measured by multiplexed assay after 18 hours NKp30, NKp44 or NKp46 ligation. Cells from 5 independent donors were pelleted and supernatants were collected. Values represent mean values \pm s.e.m. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, one-way analysis of variance with Bonferroni post-test.

Supplementary Methods

RT-PCR

Total cellular RNA was isolated from dNK or pNK cells using an RNeasy kit (Qiagen, France). First-strand cDNA was synthesized from 1 µg total RNA using SuperScript III reverse transcriptase and random primers, according to the manufacturer's protocol (Life Technologies, France). PCR primers for *NCR3*¹⁰, *NCR2* and the *actin* housekeeping transcripts were designed using an NCBI primer blast and their positions are indicated in Supplementary Fig. 1a and Table 1. PCR reactions were performed in a DNA thermal cycler (Perkin-Elmer) as follows: initial incubation at 55°C for 2 min, denaturation at 95°C for 10 min followed by 30 cycles (35 s at 95°C, 45 s at 56°C, 45 s at 72 °C). PCRs were normalized to that of *β-actin* housekeeping gene run for 25 cycles.

Cumulative CD107a staining

To assay cumulative degranulation, CD107a fluorochrome-conjugated antibody (BD-Pharmingen) was added at the beginning of stimulation along with 5 µg ml⁻¹ monensin (Sigma Aldrich). After 4 h, cells were chilled at 4°C, washed in PBS and stained for CD3 and CD56 with specific antibodies. Flow Cytometry gates for positive CD107a expression were defined on CD3^{neg}CD56^{pos} unstimulated controls.

Immunoblotting

NK cells were stimulated for 20 min through receptor cross-linking on anti-NKp30- (clone-210847), anti-NKp44- (polyclonal goat IgG) or anti-NKp46-specific antibodies (clone-195314) coated plates. Cells were lysed in sample buffer (1% NP40, 20 mM HEPES (pH 7.9), 10 mM KCl, 1mM EDTA, 1 mM PMSF, 1% glycerol and cocktail of proteases and phosphatases inhibitors). 8 µg of proteins separated 4–15% denaturing-gradient gel, electrotransferred to Immobilon membrane. Immunoblots were performed on the same with anti-phospho tyrosine mouse monoclonal antibody (4G10R-Platinum: Millipore, 1:5,000 dilution), anti-phospho Vav-1 (Tyr 174) rabbit polyclonal antibody (sc-16408-R, Santa Cruz, 1:1,000 dilution), anti-phospho p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) rabbit monoclonal antibody (Cell Signaling, 1:5,000 dilution) and normalized to *β-actin* mouse monoclonal antibody (MAB1501: Millipore, 1:10,000 dilution). After each blotting, the membrane was stripped using mild stripping buffer. Blots were developed with ECL plus (Amersham), according to manufacturer's instructions. Images were captured using BioRad Chemidoc system (BioRad).

IV. Un biais fonctionnel des lymphocytes T CD8 effecteurs mémoire sous-tend la pathogenèse exacerbée du virus de l'hépatite E chez les personnes âgées

Dans la dernière partie de mes travaux de thèse, nous nous sommes intéressés à la pathogenèse du virus de l'hépatite E (VHE) chez les personnes âgées, qui ont un risque plus important de développer des formes symptomatiques de l'infection [819]. Cependant, les mécanismes responsables de cette pathogenèse exacerbée chez les personnes âgées ne sont pas connus. Afin de comprendre les mécanismes qui contribuent à la sévérité de la pathologie chez les personnes âgées, j'ai participé un projet collaboratif initié par un chercheur post-doctorant dans notre équipe.

Le VHE n'étant pas un virus lytique, nous avons émis l'hypothèse que les dommages hépatiques observés dans les formes symptomatiques sont causés par une réponse immune inadaptée et/ou exacerbée. Afin de tester cette possibilité, nous avons utilisé des PBMC de patients symptomatiques, de patients asymptomatiques et de contrôles sains (séronégatifs pour le VHE) âgés de plus de 60 ans. Nous avons alors caractérisé le phénotype de différentes populations de l'immunité innée (NK) et adaptative (LT) par cytométrie en flux. Les cellules NK ont été sélectionnées sur la base de leur phénotype CD56⁺CD3⁻. Concernant les LT, nous avons utilisé différents marqueurs pour cibler les LT CD4 et CD8 naïfs, centraux mémoires, effecteurs mémoires et effecteurs. Dans les LT CD4, nous avons également distingué les cellules Th1, Th2 et Th17. L'ensemble des marqueurs utilisés pour définir ces différentes sous-populations est présenté en **Figure 58**. Nous souhaitons également étudier les LTreg mais cela n'a pas été possible à cause de la faible proportion de ces cellules et du nombre de PBMC limité.

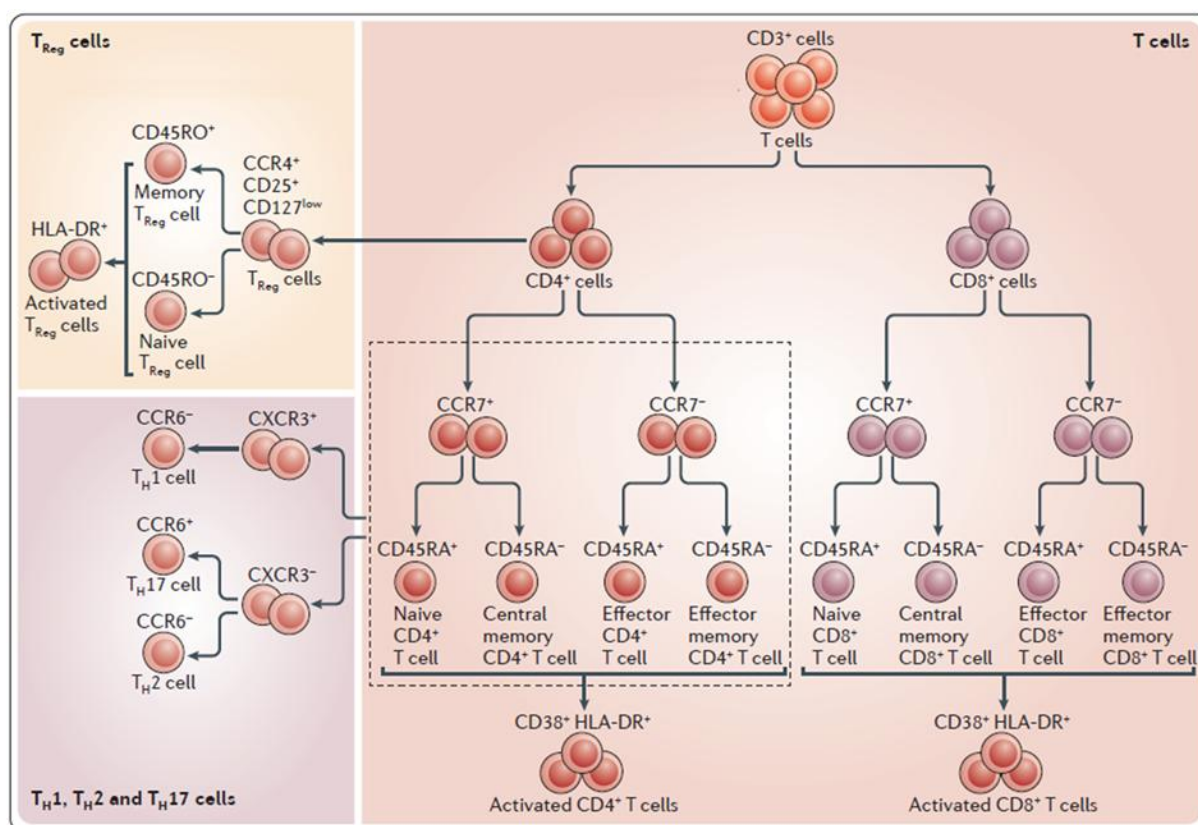


Figure 58 : Marqueurs utilisés dans la stratégie de gating des LT CD4 et LT CD8.
Adapté de [1012].

Les résultats de cette analyse nous ont révélé un profil phénotypique particulier dans la population de LT CD8 effecteurs mémoires ($CD8_{EM}$). En effet, spécifiquement chez les patients symptomatiques, cette population exprime de nombreux marqueurs d'activation (CD38, HLA-DR), de costimulation (CD27, ICOS) mais aussi de nombreux récepteurs inhibiteurs (PD-1, TIM-3, LAG-3). De plus, une proportion importante de ces cellules a un phénotype « hyper-activé » et exprime simultanément CD38, HLA-DR et PD-1. De plus l'analyse fonctionnelle de cette population a révélé un défaut de sécrétion de $TNF-\alpha$ associé à une perte de polyfonctionnalité. Ces défauts fonctionnels sont encore plus importants dans les cellules hyper-activées. Enfin, nous avons également observé l'émergence d'une population de LT $CD8_{EM}$ qui exprime plus faiblement le CD8 ($CD8^{low}$) et qui produit de grandes quantités d'IL-4, suggérant alors un biais fonctionnel vers un lignage Tc2.

En conclusion, cette étude nous a permis de montrer que les patients âgés symptomatiques présentent un biais phénotypique et fonctionnel dans leurs LT $CD8_{EM}$. Ce défaut pourrait être responsable de la sévérité accrue de l'infection chez ces patients. Ces travaux, dont je suis deuxième auteur, sont actuellement en cours de publication. L'importance de ces travaux et les perspectives de ce projet seront détaillés dans la partie Discussion.

Functional Bias of Effector Memory CD8 T cells underlie Hepatitis E Virus Genotype 3 Pathogenesis in the Elderly

Hicham El Costa,^{1,2} Jordi Gouilly,¹ Florence Abravanel,^{1,2} Elmostafa Bahraoui,¹ Nabila Jabrane-Ferrat,^{1} and Jacques Izopet^{1,2*}*

¹CPTP, INSERM U1043-CNRS UMR5282-Université Toulouse III, 31024 Toulouse, France.

²Laboratoire de Virologie, IFB, CHU Toulouse, 31059 Toulouse, France.

*Share senior authorship.

(J.G.) jordi.gouilly@inserm.fr,

(F.A.) abravanel.f@chu-toulouse.fr,

(E.B.) elmostafa.bahraoui@univ-tlse3.fr,

(N.J.F.) nabila.jabrane-ferrat@inserm.fr,

(J.I.) izopet.j@chu-toulouse.fr,

(H.E.C.) hicham.el-costa@inserm.fr.

Keywords: activation marker, inhibitory receptor, polyfunctionality, TNF- α , IL-4

Contact information: Hicham El Costa, PhD, INSERM U1043, CNRS UMR5282, Université Toulouse III, 31024 Toulouse, France. Phone: (33) 562-74-45-37, Fax: (33) 562-74-45-58. E-mail: hicham.el-costa@inserm.fr.

List of abbreviations: HEV, Hepatitis E virus; HBV, Hepatitis B virus; HCV, Hepatitis C virus; EBV, Epstein-Bar virus; CMV, Cytomegalovirus; HIV, Human immunodeficiency virus; IL-, interleukin; TNF, Tumor necrosis factor; IFN, Interferon; ORF, Open reading frame; E, Effector; N, Naïve; EM, Effector memory; CM, Central memory; TCR, T cell receptor; Tc, CD8 cell subset; qRT-PCR, Real time quantitative polymerase chain reaction; PBMC, Peripheral blood mononuclear cell; Ig, Immunoglobulin; S, symptomatic, S ; AS, asymptomatic; HLA-DR, Human leukocyte antigen -antigen D related; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; Iono, ionomycin; CD, Cluster of differentiation; CCR, Chemokine receptor; iRs, inhibitory receptors; PD-1, Programmed cell death 1; TIM-3, T cell immunoglobulin and mucin domain 3; LAG-3, Lymphocyte-activation gene 3; ICOS, Inducible T-cell costimulator.

Financial support: INSERM, CNRS, and Toulouse III University (to N.J.F., J.I.), and ANRS-ECTZ2844 (to N.J.F.).

Abstract

Aging has been associated with high susceptibility to a variety of viral infections including Hepatitis E virus genotype 3 (HEV-3). Nonetheless, why some elderly patients develop icteric hepatitis E with liver damage while others remain asymptomatic is yet to be defined. Herein, we aimed at elucidating the mechanisms underlying this discrepancy in HEV-3 pathogenesis. Since HEV-3 *per se* is noncytopathic, we assessed the phenotypic and functional plasticity of CD8 T cells during symptomatic *versus* asymptomatic infection in patients aged 60 or older with similar viral load and subtype distribution. Among CD8 T subsets, effector memory cells (EM) were involved in the outcome of HEV-3 infection. Patients with clinical symptoms were characterized by an increased proportion of highly activated EM CD8 T cells overexpressing HLA-DR and CD38 activation markers along with high levels of the immune checkpoint inhibitor PD-1, TIM-3 and LAG-3. This activation status was associated with loss of TNF- α production, marked shift towards monofunctional cells producing IFN- γ and partial commitment of the EM compartment to type-2 cells producing IL-4. By contrast, EM CD8 T cells from asymptomatic patients were endowed with moderate activation and efficient secretory function. **Conclusion:** Excessive activation associated with qualitative and quantitative defects in cytokine production within the EM CD8 T cell compartment underlie the clinical complications of HEV-3 infection in the elderly.

INTRODUCTORY STATEMENT

Hepatitis E Virus (HEV) is a positive-sense single-stranded RNA virus that belongs to the *Hepeviridae* family. Human cases of hepatitis E are caused by *Orthohepevirus A* species which comprises 7 genotypes (1). HEV genotype 3 (HEV-3) is mostly prevalent in high-income countries and is transmitted by contaminated water or the consumption of undercooked products from infected animals. In healthy young adults, HEV-3 infection follows mostly a clinically silent course and resolves spontaneously (2). However, the infection is often associated with adverse outcomes in senior people. One third of elderly infected patients, mostly men, develop clinical symptoms with acute icteric hepatitis and in some cases severe liver damage (3-5). Nonetheless, the origin of this disease burden remains elusive.

There is growing evidence that host immune response rather than the virus itself is involved in the pathogenesis of HEV-3 infection (6). This issue has been clearly highlighted in immunocompromised patients where persistent HEV-3 infection and further development of chronic disease are associated with weak specific T cell response and increased expression of inhibitory receptors (iRs), such as the programmed cell death 1 (PD-1) and the cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) (7, 8). Among T cells populations, CD8 T cells play a critical role in the immune response against HEV-3 infection. These cells massively infiltrate the liver during the acute phase of infection (9) and display a strong response with secretion of antiviral cytokines against well conserved regions of the HEV-3 open reading frame 2 (ORF2) protein (10, 11).

CD8 T cell population can be subdivided into four subsets based on the expression of the CD45RA leukocyte common antigen isoform and the chemokine receptor CCR7 (12). Accordingly, the CD45RA⁺CCR7⁺ are naïve (N), CD45RA⁺CCR7⁻ effector (E), CD45RA⁻CCR7⁺ central memory (CM) and CD45RA⁻CCR7⁻ are effector memory (EM) cells. Efficient T cells activation requires at least three signals provided by T-cell receptor engagement, costimulatory molecules signaling and cytokines microenvironment. This activation process is accompanied by the expression of iRs such as PD-1, T cell immunoglobulin and mucin domain 3 (TIM-3) and Lymphocyte-activation gene 3 (LAG-3) in order to control overwhelming T cell activation and limit tissue injury (13, 14). Consequently, the expression of iRs along with activation markers such as Human leukocyte antigen-D related (HLA-DR) and CD38 reflect the signature of ongoing T cell activation. At the functional level, CD8 T cells can be classified into at least two subsets,

Tc1 cells producing high amounts of interferon (IFN)- γ and Tc2 cells characterized by interleukin (IL)-4 secretion (15, 16).

The immunological landscape of CD8 T cell compartment is widely shaped with aging at the phenotypic and functional levels, placing elderly people at high risk for infectious disease including Hepatitis E (2, 17-19). Nonetheless, why some elderly develop symptomatic hepatitis E while others remain asymptomatic is yet to be discovered. Since HEV-3 *per se* is noncytopathic, we herein investigated the implication of CD8 T cells in the HEV-3 associated clinical symptoms in elderly individuals. Analysis of CD8 T cell subsets in HEV infected patients harboring similar viral loads and subtype distribution, revealed that symptomatic patients display strong activation of EM CD8 T cells associated with qualitative and quantitative defects in type-1 and type-2 cytokine production. Our findings suggest that the nature of EM CD8 T cell response dictates the outcome of HEV-3 infection in elderly population.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

ETHICS STATEMENT

All patients provided written consent. The study was approved by the French South-West & Overseas ethical committee and was registered at the Ministry of Higher Education and Research (number DC-2016-2772). Experiments were performed in agreement with the guidelines of the Declaration of Helsinki.

STUDY POPULATION

Twenty immunocompetent elderly subjects (≥ 60 years) including symptomatic ($n=7$) and asymptomatic ($n=5$) patients during the acute phase of HEV-3 infection and healthy donors ($n=8$) were enrolled in this study. Patients were recruited at the Toulouse University Hospital. Healthy donor samples were provided by the French National Blood Service. Blood samples from HEV-infected patients were collected at the peak of alanine aminotransferase levels (ALT). By contrast to asymptomatic infections, symptomatic patients developed nonspecific symptoms such as nausea, abdominal pain, vomiting, anorexia and malaise in addition to HEV-3 associated symptoms documented in table 1. All patients were IgM negative and IgG positive for EBV and CMV. HEV patients and healthy controls were negative for HBV, HCV and HIV. None of the subjects had any past history of liver disease or severe illness.

HEV VIREMIA AND GENOTYPING

Anti-HEV antibodies were detected using Wantai HEV-IgG and -IgM assays (Wantai Biologic Pharmacy Enterprise, Beijing, China), according to the manufacturer's instructions. RNA was extracted from blood samples using Total Nucleic Acid Isolation kit on the Cobas Ampliprep instrument according to the manufacturer's instructions (Roche Diagnostics, France). A real-time PCR technique amplifying a fragment in the ORF3 region was used for detection and quantification of viral RNA (20). HEV genotype was determined by sequencing ORF2 region (21).

PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS (PBMC) PREPARATION

PBMC were obtained from blood samples by density gradient centrifugation using Ficoll Paque Plus (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Cells were cryopreserved for further analysis.

PBMC STIMULATION

A total of 10^6 PBMC were incubated with or without 50ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and 1 μ M ionomycin (Sigma-Aldrich) for 3 hours or overnight in 96-well U-bottom plates in 200 μ l of medium (RPMI 1640, Life technologies) supplemented with 10% of heat-inactivated fetal bovine serum. To enable intracellular cytokine accumulation, BD GolgiPlug (BD Bioscience, San Jose, USA) was added in both stimulated and unstimulated conditions according to the manufacturer's instructions.

CELL STAINING AND MULTI-PARAMETER FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS

Cells were washed with PBS and stained with LIVE/DEAD Fixable Yellow Dead Cell Stain Kit for 30 minutes at room temperature according to the manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). After several washes nonspecific binding was blocked by pre-incubation of the cells with PBS supplemented with 10% human serum. Surface markers staining was carried out in PBS supplemented with 1% human serum for 30 minutes at 4°C. The following antibodies were used: anti-CD3 PE-Vio615 (clone REA613), anti-CD8 VioBlue (clone BW135/80), anti-CCR7-PerCP-Vio700 (clone REA546), anti-CD45RA-VioGreen (clone REA562), anti-HLA-DR-APC-Vio770 (clone AC122), anti-CD38-PE-Vio770 (Clone REA572), anti-CD127-PE (clone MB15-18C9), anti-CD161-PE-Vio770 (clone 191B8), anti-TIM-3-FITC (clone F38-2E2), anti-LAG-3-APC (clone REA351), anti-CD27-VioBrightFITC (clone M-T271), anti-CD28-PE (clone 15E8), anti-ICOS-APC-Vio770 (clone REA192) (Miltenyibiotec, Bergisch Gladbach, Germany) and anti-PD-1-BV786 (clone EH12) (BD Bioscience, San Jose, USA). For Intracellular staining, cells were washed then fixed and permeabilized using fixation/permeabilization kit (Ebioscience, San Diego, USA) according to the manufacturer's instructions. Intracellular staining was performed for 30 minutes at 4°C with the following antibodies: anti-IFN- γ -FITC (clone 4S.B3), anti- TNF- α -APC (clone Mab11), anti-IL-4-APC (clone 8D4-8) (BD Bioscience) and anti-IL-2-PE (clone N7.48 A) (Miltenyibiotec).

Cells phenotype was characterized by 10-color flow cytometry panels on a LSR-FORTESSA cytometer (BD Bioscience). Data were further analyzed using FlowJo™ software 10.1 (FlowJo LLC, Ashland, USA). Fluorescence-minus-one control staining was used in the panels to determine positive staining. Geometric mean fluorescent intensity was calculated relatively to the negative staining for the concerned marker (Δ MFI). Lymphocytes were selected based on their size (FSC-A) and granularity (SSC-A) parameters. Doublets and dead cells according to Live/Dead staining were then excluded. CD8 T cells were selected based on their CD3⁺CD8⁺ phenotype. Finally, using CD45RA and

CCR7 expression on CD8 T cells, we distinguished naïve ($CD45RA^+CCR7^+$), effector ($CD45RA^+CCR7^-$), effector memory ($CD45RA^-CCR7^-$) and central memory ($CD45RA^-CCR7^+$) cells.

STATISTICAL ANALYSES

Graphs represent mean values with error bars indicating the standard error of mean (S.E.M.). Statistical analysis and graphical presentation were performed using GraphPad Prism version 5 software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA). One-way analysis of variance (ANOVA) with the Newman-Keuls post-hoc test was used to compare the three subject groups. Paired and unpaired *t* test were used to compare 2 parameters from the same or different donor, respectively. Correlations were evaluated by linear regression analyses and Spearman correlation test. Principal Component Analysis was performed using ClustVis web tool (<http://biit.cs.ut.ee/clustvis/>). Values were centered, unit variance scaling was applied to rows and single value decomposition with imputation was used to calculate principal components. P values <0.05 were considered significant (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001).

RESULTS

CHARACTERISTICS OF STUDY SUBJECTS

To investigate the role of CD8 T cells in HEV-3 pathogenesis in elderly patients, we enrolled 20 immunocompetent subjects aged ≥ 60 years including 12 HEV-3 infected patients and 8 healthy donors. Patient characteristics are detailed in table 1. Blood samples used for virological and immunological investigations were collected at the acute phase of the infection. Within HEV-3 infected patients, 7 experienced clinical symptoms related to liver disease while 5 were asymptomatic. Both symptomatic and asymptomatic patients displayed similar viral load and subtype distribution.

EXCESSIVE ACTIVATION WITH PROFOUND PHENOTYPIC ALTERATIONS DIFFERENTIATE THE EM CD8 T CELL COMPARTMENT IN SYMPTOMATIC HEV-3 INFECTION

To assess whether acute HEV-3 infection shapes the phenotype of CD8 T cell compartment, we conducted a multi-parameter flow cytometric analysis on Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) from infected patients and healthy donors. No significant differences were found in the proportion of total CD8 T cells from all subjects (Fig. 1A). However, analysis of CCR7 and CD45RA expression, relative to asymptomatic and healthy groups, revealed that the frequency of EM subset is significantly increased in symptomatic patients whilst the frequency of naïve cells is decreased (Fig. 1B). Representative dot plots of CD8 T cell subsets distribution according to CCR7 and CD45RA expression are depicted in Figure 1C.

To examine the plasticity of CD8 T cells during the acute phase of infection, we assessed the expression of activation markers (HLA-DR and CD38), costimulatory receptors (CD27 and inducible T-cell costimulator (ICOS), iRs (PD-1, TIM-3 and LAG-3) and memory markers (CD161 and CD127). Drastic phenotypic changes were specifically observed within the EM compartment, while N, E and CM subsets did not show major differences (Fig. 1D and Supporting Fig. S1A). Compared to asymptomatic and healthy subjects, EM CD8 compartment from symptomatic patients exhibited significantly higher proportion of HLA-DR, CD38, PD-1, TIM-3, LAG-3, CD27 and ICOS positive cells (Fig. 1 D). Conversely, we found lower proportion of CD127 and CD161 positive cells (Fig. 1D). Density expression of HLA-DR, CD38, PD-1 and CD27 quantified by geometric mean fluorescence intensity (MFI) was also higher in EM CD8 T cells from symptomatic patients (Supporting Fig. S1B). On the other hand, EM CD8 T cells from asymptomatic patients displayed less pronounced changes and significant differences were found only for CD38, PD-1 and CD127 expression compared

to healthy subjects (Fig. 1D). This phenotypic signature of symptomatic patients is reminiscent of exacerbated activation and/or exhaustion features of CD8 T compartment reported for other viral infections (13, 22-24). We therefore investigated whether the phenotype of EM CD8 T cells is linked to their activation status. Correlation analysis showed that the expression level of HLA-DR is negatively correlated to CD127 and CD161 expression and positively correlated to the expression of PD-1, ICOS and CD27. Similar correlation profiles were observed when the expression of these markers was compared to CD38 expression (Supporting Fig S2A). Hence, these analyses show that the phenotypic changes during HEV-3 infection are correlated with immune activation status of the EM compartment, with high threshold in symptomatic patients. This notion is further highlighted by the restricted triple expression of PD-1/TIM-3/LAG-3 to EM CD8 T cells from symptomatic patients (Supporting Fig. S2B) especially that T cell activation has been tightly linked to the expression level of iRs (25). Finally, to visualize the global pattern of EM subsets during acute infection, we included all the aforementioned markers in a principal component analysis (Fig. 1E). Infected patients naturally clustered into two groups, delineating distinct phenotypes with an increased/exacerbated immune activation for symptomatic patients and an intermediate profile for asymptomatic ones. Taken together, our results clearly demonstrate that the activation threshold of EM CD8 T cell subset is correlated to the outcome of HEV-3 infection in the elderly.

COORDINATED EXPRESSION OF HLA-DR, CD38, AND PD-1 DISCRIMINATES HEV-3 SYMPTOMATIC INFECTION

To provide a concise phenotypic signature discriminating symptomatic from asymptomatic patients, we focalized our analysis on three representative markers, HLA-DR, CD38 and PD-1. The EM compartment from symptomatic patients was strikingly marked by an increased frequency of cells coexpressing HLA-DR/CD38/PD-1, accounting for more than 40% of the cells (Fig. 2A, 2B). This feature was associated with a significant decrease in the frequency of cells expressing none of these markers (Fig. 2A, 2C). Together, these observations further confirm the high activation status of EM CD8 T cells in symptomatic patients. By contrast, EM subset from asymptomatic patients encompassed relatively low levels of triple positive cells and was characterized by a slight increase of cells expressing single activation marker further highlighting their mild activation status (Fig. 2A, 2B and 2D). Representative dot plots of HLA-DR, CD38 and PD-1 expression within the EM compartment are shown in Figure 2E. Collectively, our results show that HLA-DR/CD38/PD-1 triple expression is a highly relevant

marker to probe the activation threshold of CD8 T cell EM compartment during the acute phase of HEV-3 infection and to predict the disease outcome in the elderly.

LOSS OF POLYFUNCTIONAL TYPE-1 CYTOKINE PRODUCTION BY HIGHLY ACTIVATED EM CD8 T CELLS FROM SYMPTOMATIC PATIENTS

To investigate whether the observed phenotypic changes are associated with functional alterations in symptomatic patients, we checked the ability of EM CD8 T cells to produce type-1 cytokines involved in the anti-viral immune responses. PBMCs were subjected to a brief polyclonal stimulation and the production profile of tumor necrosis factor (TNF)- α , IFN- γ and IL-2 was assessed by intracellular staining. Compared to asymptomatic and healthy subjects, we found significant decreases in the frequency of TNF- α producing cells (Fig. 3A left panel and Supporting Fig. 3A). Furthermore, the amount of TNF- α represented by MFI in EM cells from symptomatic patients was drastically lower than in the other two groups (Fig. 3A, right panel). This drop in the amount of TNF- α was not corrected under stronger stimulation, suggesting that the impairment in TNF- α production is due to an intrinsic defect in EM cells from symptomatic patients (Supporting Fig. S3B). By contrast, the overall amounts of IFN- γ and IL-2 were not different between study groups despite the fact that IL-2 followed the same trend as TNF- α (Fig. 3B, 3C). Since efficient CD8 T cells response is dependent on polyfunctional secretion (26-28), we next analyzed the frequency of EM CD8 T cells producing different permutations of these three cytokines. Gating strategy is shown in Supporting Fig. S3C. While the cytokine profile of EM CD8 T cells from asymptomatic and healthy subjects was not affected, symptomatic patients displayed a marked increase in the frequency of single positive IFN- γ producing cells and a decrease in the double positive IFN- γ /TNF- α population (Fig. 3D). Given that IFN- γ production was not affected, the increased frequency of monofunctional cells is likely due to a loss of their capacity to coproduce TNF- α . Representative dot plots of IFN- γ and TNF- α production in EM are shown in Figure 3E.

Since excessive activation of immune cells can lead to functional impairment, we next addressed whether the loss of polyfunctionality is related to EM CD8 T cell activation or exhaustion (13, 29). We characterized the expression of HLA-DR, CD38 and PD-1 on monofunctional IFN- γ producing cells from symptomatic patients (Fig. 3F). The expression of these markers was not modified upon polyclonal stimulation (Supporting Fig. S4A). We found that, more than 70% of monofunctional IFN- γ -producing cells coexpress the three markers suggesting that the loss of EM CD8 T cell polyfunctionality in symptomatic patients is linked to their high activation. To further confirm these observations, we

assessed the intracellular IFN- γ , TNF- α and IL-2 coproduction in EM CD8 T cells from our study groups based on the expression/coexpression of HLA-DR, CD38 and PD-1 (Supporting Fig. 4B). Functional impairments were observed only within the major subset of EM CD8 T cells from symptomatic subjects coexpressing HLA-DR/CD38/PD-1 with significantly more cells producing only IFN- γ and less IFN- γ /TNF- α double positive cells (Supporting Fig. 4C). The other cells expressing one or none of these markers did not show any difference in cytokine production between study groups (Supporting Fig. S4D). Taken together, our results show that highly activated cells exhibit loss of polyfunctionality while low/moderately activated cells are fully functional. Thus, functional impairment of the EM CD8 T cell compartment combined with excessive activation may underlie symptomatic HEV-3 infection.

PARTIAL COMMITMENT OF EM CD8 T COMPARTMENT TO TYPE-2 CELLS PRODUCING IL-4 IN HEV-3 SYMPTOMATIC INFECTION

Interestingly, symptomatic patients were characterized by the accumulation of an EM CD8 T cell subset expressing low level of CD8 (CD8L, Fig. 4A) that may correspond to previously described type 2 cytokine producing cells (16). Since the accumulation of Tc2 cells with aging has been clearly associated with delayed viral clearance (15, 30, 31), we reasoned that a bias in CD8L subset might be involved in HEV-associated clinical symptoms. We first sought to determine the production of IL-4 in EM CD8 T cells. In agreement with previously published data (16), analysis revealed that IL-4 production is restricted to CD8L cells (Supporting Fig. 5A, 5B). Importantly, nearly 60% of CD8L subset from symptomatic patients produced IL-4, while asymptomatic patients exhibited a moderate proportion of these cells (Fig. 4B). Representative dot plots of IL-4 staining in EM CD8 T cells are shown in Figure 4C. Given that IL-4 interferes with type-1 cytokine production (16), we next analyzed the production of IFN- γ , TNF- α and IL-2 in CD8L cells. IFN- γ was barely detected in IL-4-producing cells indicating a commitment of these cells to type-2 lineage (Supporting Fig. 5C). Likewise, CD8L from symptomatic patients harbored significantly lower proportion of TNF- α producing cells compared to asymptomatic and healthy donors (Fig. 4C). Furthermore, TNF- α correlated negatively with IL-4 production (Fig. 4E). By contrast, differences in IFN- γ and IL-2 production did not reach significance between subject groups (Supporting Fig. 5E). These observations suggest that IL-4 contributes to the impairment of type-1 cytokine production in symptomatic patients.

Finally, we assessed the relationship between IL-4 production and the activation status of CD8L cells. To this end, we analyzed the expression of HLA-DR, CD38 and PD-1 on CD8L cells of symptomatic patients according to IL-4 production (Fig. 4F). We found that, more than 50% of IL-4 producing cells are HLA-DR/CD38/PD-1 triple positives while only a small fraction of cells express none of these markers. By contrast, considerable proportion of cells expressing either one activation marker or none did not produce IL-4 (Fig. 4G). Accordingly, these observations show that IL-4 producing cells are highly activated while IL-4 negative cells exhibit low activation threshold. Altogether, we show here that EM CD8 T compartment in symptomatic patients is skewed towards highly activated Tc2 cells producing IL-4.

DISCUSSION

In this study, we aimed at elucidating the mechanisms underlying the pathogenesis of HEV-3 infection in the elderly through phenotypic and functional characterization of peripheral CD8 T cell subsets in symptomatic and asymptomatic patients.

The EM CD8 T cell compartment of symptomatic patients exhibited deep phenotypic alterations compared to asymptomatic and healthy subjects. The most striking pattern was the overexpression of the immune checkpoint inhibitor PD-1, TIM-3 and LAG-3 along with high levels of HLA-DR and CD38 activation markers. Upregulation of inhibitory molecules has been widely described as the hallmark of T cell exhaustion in chronic infection and cancer. Nonetheless, experimental mouse model of T cell exhaustion revealed strong upregulation of iRs in both acute and persistent infections (32). Sustained expression and/or further increases have been observed only in chronic settings suggesting that the expression of iRs depends on the pathophysiological context. Along this line, other studies demonstrated that expression level of iRs in healthy individuals relies on the degree of T cell activation/differentiation and provides a negative feedback to overwhelming activation (13, 25). Given that HEV-3 does not persist in immunocompetent host including our patients, iRs expression rather emphasizes here the notion of ongoing CD8 T cell activation.

Thus, the high levels of activating markers along with the exclusive expression of iRs underscore the magnitude of EM CD8 T cell immune response in symptomatic patients.

This activation status was further highlighted by the downregulation of CD127, critical for the CD8 T cell memory homeostasis, and CD161 that defines a distinct functional subset with liver homing properties (23, 33, 34). Similar phenotypic profiles have been reported for other viral hepatitis and have been associated with poor outcomes (22-24, 33). However, the exact role of these receptors during viral infection is yet to be defined. The overall skewing of the EM compartment in symptomatic patients points to a bystander effect of non-specific CD8 T cells, given that HEV-3 specific CD8 T cells represent less than 2% of EM cells (11). Similar generalized dysregulation has been previously incriminated in liver immunopathogenesis during other infectious hepatitis (35). Proinflammatory environment during HEV-3 infection, cross-activation of T cells specific for latent viruses such as CMV or EBV and/or depletion/accumulation of some metabolites (35-38) may shape the CD8 memory compartment and contribute to clinical symptoms in elderly patients. Since neither viral load nor subtype can discriminate the clinical burden of HEV-3 infection in the elderly, the changes within the EM CD8 T cell compartment in particular the HLA-DR/CD38/PD-1 expression may be valuable biomarker for predicting the infection outcome.

Surprisingly, excessive activation of EM CD8 T cells in symptomatic patients was contrasted with a partial loss in TNF- α , and to a lesser extent IL-2, production. This loss of polyfunctionality led to a marked shift towards monofunctional cells producing only IFN- γ .

Comparable shifts in the cytokine profile have been reported in early phase of T cells exhaustion (39), suggesting that HEV-3 in symptomatic patients shares common features with persistent viruses in term of immune response magnitude. However, the resolution of inflammation and the clearance of antigen reported in HEV-3-infected immunocompetent patients circumvent probably the commitment to full exhaustion.

Another feature of symptomatic patients was the emergence of type-2 CD8L subset producing IL-4. In contrast to type-1 cytokines, IL-4 production was enhanced in activated cells and correlated negatively with TNF- α , further suggesting that IL-4 may serve as negative feedback loop to dampen the intensity of the ongoing immune response. Indeed, IL-4 can decrease type-1 cytokines and inhibit cytolytic function of neighboring CD8 T cells (30, 31). Aging, persistent antigen presentation and cytokine microenvironment promote the differentiation of CD8L cells (15, 16, 40). Whether high proportion of this subset in symptomatic patients is concomitant or anterior to HEV-3 infection warrant further investigation. However, the presence of a low frequency of IL-4 producing cells in asymptomatic patients but barely in healthy controls supports viral contribution.

The magnitude and the quality of T-cell response, represented respectively by the frequency of responsive cells and the nature/diversity of functional response, are critical for viral clearance or disease progression (27). Both metrics were perturbed in EM compartment from HEV-3 symptomatic patients when compared to asymptomatic and healthy subjects. TNF- α not only synergize with IFN- γ to improve the immune response but also inhibit HEV replication (41). In addition, monofunctional IFN- γ producing cells, in contrast to polyfunctional ones, are not sufficient immune correlates of protection (26-28). Moreover, neither the suppressive properties of CD8 low subset nor the IL-4 production would help T immune response to clear the virus (16, 42). Therefore, the impairment in type-1 and type-2 cytokine production may participate actively to HEV-3 associated clinical complications in the elderly.

Previous study suggested the involvement of CD8 T cells in the pathogenesis of HEV genotype 1 (HEV-1) that represent a public health concern in East and South Asia (9). In addition, a bias in type-1 and type-2 cytokine balance might promote HEV-1 associated adverse pregnancy outcome (43). Based on these observations, it would be interesting to assess whether HEV-1 shares common features with HEV-3 and imprints the EM CD8 T cell

compartment further promoting clinical disorders. Such parallel may help to unveil the mechanistic aspects of HEV-1 pathogenicity that remains unclear.

In summary, by combining a wide set of immunological markers, we delineate HEV-3 infected patients into two distinct immune activation status and provide a phenotypic signature that might have implications for diagnosis and clinical management of HEV-3 infection. Moreover, we demonstrate for the first time that impairment in type-1 and type-2 cytokine production by EM CD8 T cells promote HEV-3 pathogenesis in the elderly. Our data suggest also that favorable outcome of HEV-3 infection relies on the generation and/or maintenance of polyfunctional EM CD8 T cells.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to thank MDs and the clinical staff from Toulouse University Hospital for providing the clinical samples, Dr. Anne Dejean for her valuable inputs on the manuscript scientific discussions and the flow cytometry core facility (CPTP-INSERM U1043).

REFERENCES

1. Purdy MA, Harrison TJ, Jameel S, Meng XJ, Okamoto H, Van der Poel WHM, Smith DB, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Hepeviridae. *J Gen Virol* 2017;98:2645-2646.
2. Kamar N, Izopet J, Pavio N, Aggarwal R, Labrique A, Wedemeyer H, Dalton HR. Hepatitis E virus infection. *Nat Rev Dis Primers* 2017;3:17086.
3. Dalton HR, Thuraiajah PH, Fellows HJ, Hussaini HS, Mitchell J, Bendall R, Banks M, et al. Autochthonous hepatitis E in southwest England. *J Viral Hepat* 2007;14:304-309.
4. Mansuy JM, Bendall R, Legrand-Abravanel F, Saune K, Miedouge M, Ellis V, Rech H, et al. Hepatitis E virus antibodies in blood donors, France. *Emerg Infect Dis* 2011;17:2309-2312.
5. Manka P, Bechmann LP, Coombes JD, Thodou V, Schlattjan M, Kahraman A, Syn WK, et al. Hepatitis E Virus Infection as a Possible Cause of Acute Liver Failure in Europe. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2015;13:1836-1842 e1832; quiz e1157-1838.
6. Krain LJ, Nelson KE, Labrique AB. Host immune status and response to hepatitis E virus infection. *Clin Microbiol Rev* 2014;27:139-165.
7. Suneetha PV, Pischke S, Schlaphoff V, Grabowski J, Fytli P, Gronert A, Bremer B, et al. Hepatitis E virus (HEV)-specific T-cell responses are associated with control of HEV infection. *Hepatology* 2012;55:695-708.
8. Abravanel F, Barrague H, Dorr G, Saune K, Peron JM, Alric L, Kamar N, et al. Conventional and innate lymphocytes response at the acute phase of HEV infection in transplanted patients. *J Infect* 2016;72:723-730.
9. Prabhu SB, Gupta P, Durgapal H, Rath S, Gupta SD, Acharya SK, Panda SK. Study of cellular immune response against Hepatitis E virus (HEV). *J Viral Hepat* 2011;18:587-594.
10. Husain MM, Aggarwal R, Kumar D, Jameel S, Naik S. Effector T cells immune reactivity among patients with acute hepatitis E. *J Viral Hepat* 2011;18:e603-608.
11. Brown A, Halliday JS, Swadling L, Madden RG, Bendall R, Hunter JG, Maggs J, et al. Characterization of the Specificity, Functionality, and Durability of Host T-Cell Responses Against the Full-Length Hepatitis E Virus. *Hepatology* 2016;64:1934-1950.
12. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999;401:708-712.
13. Fuertes Marraco SA, Neubert NJ, Verdeil G, Speiser DE. Inhibitory Receptors Beyond T Cell Exhaustion. *Front Immunol* 2015;6:310.
14. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* 2013;13:227-242.
15. Schwaiger S, Wolf AM, Robatscher P, Jenewein B, Grubeck-Loebenstien B. IL-4-producing CD8⁺ T cells with a CD62L⁺⁺(bright) phenotype accumulate in a subgroup of older adults and are associated with the maintenance of intact humoral immunity in old age. *J Immunol* 2003;170:613-619.
16. Kienzle N, Olver S, Buttigieg K, Groves P, Janas ML, Baz A, Kelso A. Progressive differentiation and commitment of CD8⁺ T cells to a poorly cytolytic CD8^{low} phenotype in the presence of IL-4. *J Immunol* 2005;174:2021-2029.
17. Carr EJ, Dooley J, Garcia-Perez JE, Lagou V, Lee JC, Wouters C, Meyts I, et al. The cellular composition of the human immune system is shaped by age and cohabitation. *Nat Immunol* 2016;17:461-468.
18. Koch S, Larbi A, Derhovanessian E, Ozcelik D, Naumova E, Pawelec G. Multiparameter flow cytometric analysis of CD4 and CD8 T cell subsets in young and old people. *Immun Ageing* 2008;5:6.
19. Pereira BI, Akbar AN. Convergence of Innate and Adaptive Immunity during Human Aging. *Front Immunol* 2016;7:445.

20. Abravanel F, Sandres-Saune K, Lhomme S, Dubois M, Mansuy JM, Izopet J. Genotype 3 diversity and quantification of hepatitis E virus RNA. *J Clin Microbiol* 2012;50:897-902.
21. Legrand-Abravanel F, Mansuy JM, Dubois M, Kamar N, Peron JM, Rostaing L, Izopet J. Hepatitis E virus genotype 3 diversity, France. *Emerg Infect Dis* 2009;15:110-114.
22. Lv G, Ying L, Ma WJ, Jin X, Zheng L, Li L, Yang Y. Dynamic analysis of CD127 expression on memory CD8 T cells from patients with chronic hepatitis B during telbivudine treatment. *Virol J* 2010;7:207.
23. Billerbeck E, Kang YH, Walker L, Lockstone H, Grafmueller S, Fleming V, Flint J, et al. Analysis of CD161 expression on human CD8+ T cells defines a distinct functional subset with tissue-homing properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:3006-3011.
24. Barathan M, Mohamed R, Saeidi A, Vadivelu J, Chang LY, Gopal K, Ram MR, et al. Increased frequency of late-senescent T cells lacking CD127 in chronic hepatitis C disease. *Eur J Clin Invest* 2015;45:466-474.
25. Legat A, Speiser DE, Pircher H, Zehn D, Fuertes Marraco SA. Inhibitory Receptor Expression Depends More Dominantly on Differentiation and Activation than "Exhaustion" of Human CD8 T Cells. *Front Immunol* 2013;4:455.
26. Betts MR, Nason MC, West SM, De Rosa SC, Migueles SA, Abraham J, Lederman MM, et al. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood* 2006;107:4781-4789.
27. Seder RA, Darrah PA, Roederer M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol* 2008;8:247-258.
28. Boyd A, Almeida JR, Darrah PA, Sauce D, Seder RA, Appay V, Gorochoy G, et al. Pathogen-Specific T Cell Polyfunctionality Is a Correlate of T Cell Efficacy and Immune Protection. *PLoS One* 2015;10:e0128714.
29. Eller MA, Blom KG, Gonzalez VD, Eller LA, Naluyima P, Laeyendecker O, Quinn TC, et al. Innate and adaptive immune responses both contribute to pathological CD4 T cell activation in HIV-1 infected Ugandans. *PLoS One* 2011;6:e18779.
30. Moran TM, Isobe H, Fernandez-Sesma A, Schulman JL. Interleukin-4 causes delayed virus clearance in influenza virus-infected mice. *J Virol* 1996;70:5230-5235.
31. King C, Mueller Hoenger R, Malo Cleary M, Murali-Krishna K, Ahmed R, King E, Sarvetnick N. Interleukin-4 acts at the locus of the antigen-presenting dendritic cell to counter-regulate cytotoxic CD8+ T-cell responses. *Nat Med* 2001;7:206-214.
32. Wherry EJ, Ha SJ, Kaech SM, Haining WN, Sarkar S, Kalia V, Subramaniam S, et al. Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* 2007;27:670-684.
33. Fergusson JR, Fleming VM, Klenerman P. CD161-expressing human T cells. *Front Immunol* 2011;2:36.
34. Klatt NR, Chomont N, Douek DC, Deeks SG. Immune activation and HIV persistence: implications for curative approaches to HIV infection. *Immunol Rev* 2013;254:326-342.
35. Das A, Hoare M, Davies N, Lopes AR, Dunn C, Kennedy PT, Alexander G, et al. Functional skewing of the global CD8 T cell population in chronic hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2008;205:2111-2124.
36. Gisa A, Suneetha PV, Behrendt P, Pischke S, Bremer B, Falk CS, Manns MP, et al. Cross-genotype-specific T-cell responses in acute hepatitis E virus (HEV) infection. *J Viral Hepat* 2016;23:305-315.
37. Tuuminen T, Kekalainen E, Makela S, Ala-Houhala I, Ennis FA, Hedman K, Mustonen J, et al. Human CD8+ T cell memory generation in Puumala hantavirus infection

occurs after the acute phase and is associated with boosting of EBV-specific CD8⁺ memory T cells. *J Immunol* 2007;179:1988-1995.

38. Petrova M, Kamburov V. Epstein-Barr virus: silent companion or causative agent of chronic liver disease? *World J Gastroenterol* 2010;16:4130-4134.

39. Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, van der Most R, Ahmed R. Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J Virol* 2003;77:4911-4927.

40. Yen CJ, Lin SL, Huang KT, Lin RH. Age-associated changes in interferon-gamma and interleukin-4 secretion by purified human CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J Biomed Sci* 2000;7:317-321.

41. Behrendt P, Luth S, Dammermann W, Drave S, Brown RJ, Todt D, Schnoor U, et al. Exacerbation of hepatitis E virus infection during anti-TNFalpha treatment. *Joint Bone Spine* 2017;84:217-219.

42. Ouyang L, Li X, Liang Z, Yang D, Gong F, Shen G, Weng X, et al. CD8^{low} T-cell subpopulation is increased in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Mol Immunol* 2013;56:698-704.

43. Lhomme S, Marion O, Abravanel F, Chapuy-Regaud S, Kamar N, Izopet J. Hepatitis E Pathogenesis. *Viruses* 2016;8.

FIGURES

Table 1. Patient characteristics

	HEV-infected patients		Healthy controls	P Value
	Symptomatic n=7	Asymptomatic n=5	n=8	
Gender (m/f)	5/2	1/4	4/4	
Age (y)	69 ± 2.9	61.8 ± 1.8	62.8 ± 2	0.057
Physical symptoms				
Fever	5/7	1/5	N/A	N/A
Mucosal icterus	7/7	0/5	N/A	N/A
Colored urine	7/7	0/5	N/A	N/A
Discolored stools	7/7	0/5	N/A	N/A
Biochemical analysis				
ALT Level (IU/L)	1862 ± 660	530 ± 264	N/A	0.14
AST Level (IU/L)	1185 ± 476	120 ± 57	N/A	0.09
Bilirubin (μM)	179 ± 49	11 ± 1.4	N/A	0.017
PR <50%	3/7	0/5	N/A	N/A
Anti-HEV IgM	positive	positive	negative	N/A
Anti-HEV IgG	positive	positive	negative	N/A
Viral load (log copies/ml)	4.8 ± 0.5	4.1 ± 0.8	N/A	0.4
HEV-3 subtypes (3f/3c/3h/undetermined)	5/2/0/0	3/0/1/1	N/A	N/A

m, male; f, female; y, years; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; PR, Prothrombin Ratio; N/A, not applicable. Data represent mean values ± S.E.M.

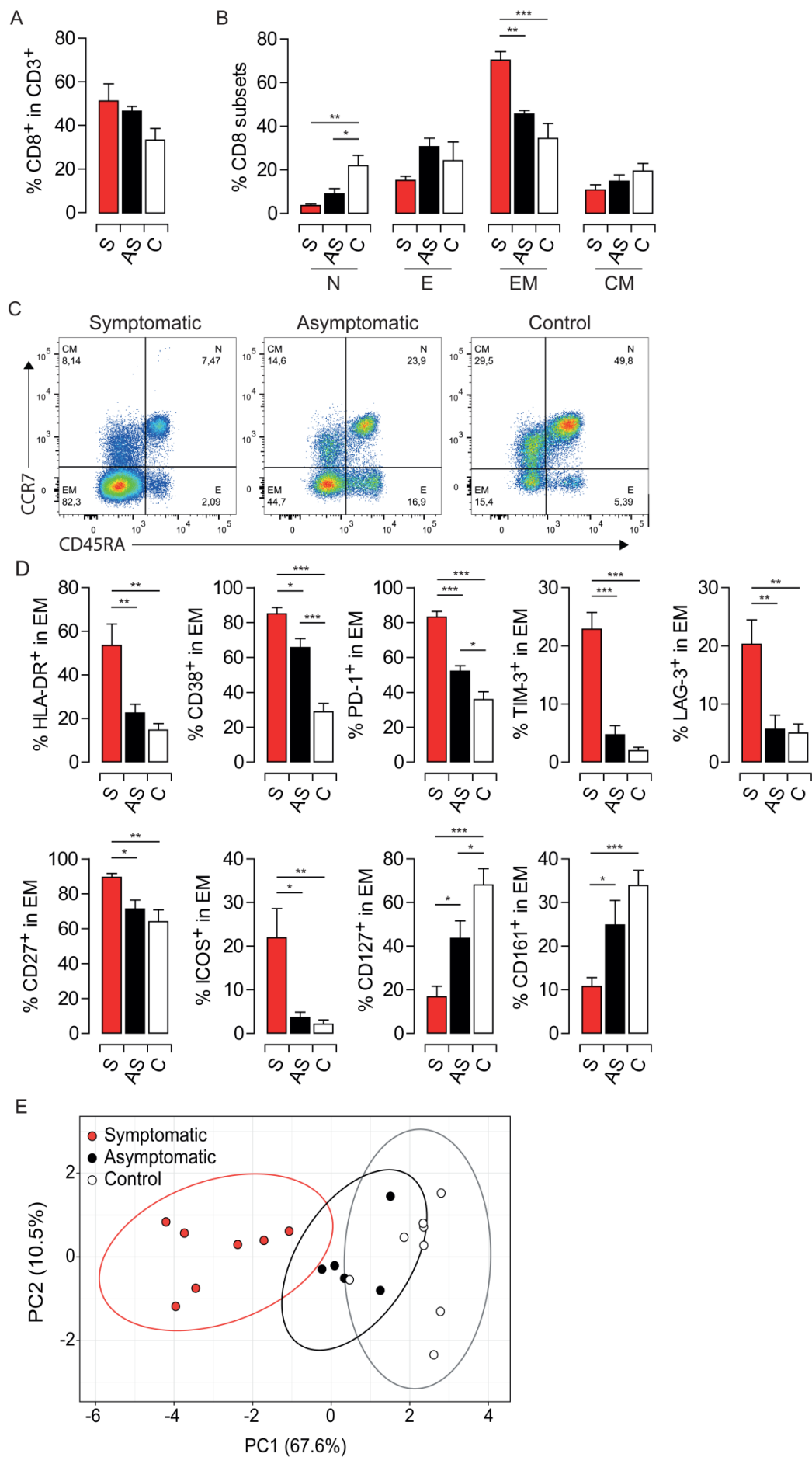


FIG. 1. Phenotypic landscape of EM CD8 T cells during symptomatic HEV-3 infection.

Symptomatic and asymptomatic patients, and healthy controls are represented on the graphs by S (red), AS (black) and C (white) respectively. (A) Percentage of CD8 T cells in CD3⁺ cells. (B) Mean percentage and (C) representative dot plot of CD8 T subsets: naïve (N), effector (E), effector memory (EM) and central memory (CM). (D) Expression of indicated markers in EM CD8 T cells. (E) Principal Component Analysis of EM CD8 T cell phenotypic signature based on HLA-DR, CD38, PD-1, TIM-3, LAG-3, CD27, ICOS, CD127 and CD161 expression. X and Y axis show PC1 and PC2 that explain 67.6% and 10.5% of the total variance, respectively. Prediction ellipses are such that, with probability of 0.95, a new observation from the same group will fall inside the ellipse. Data represent mean values±S.E.M. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

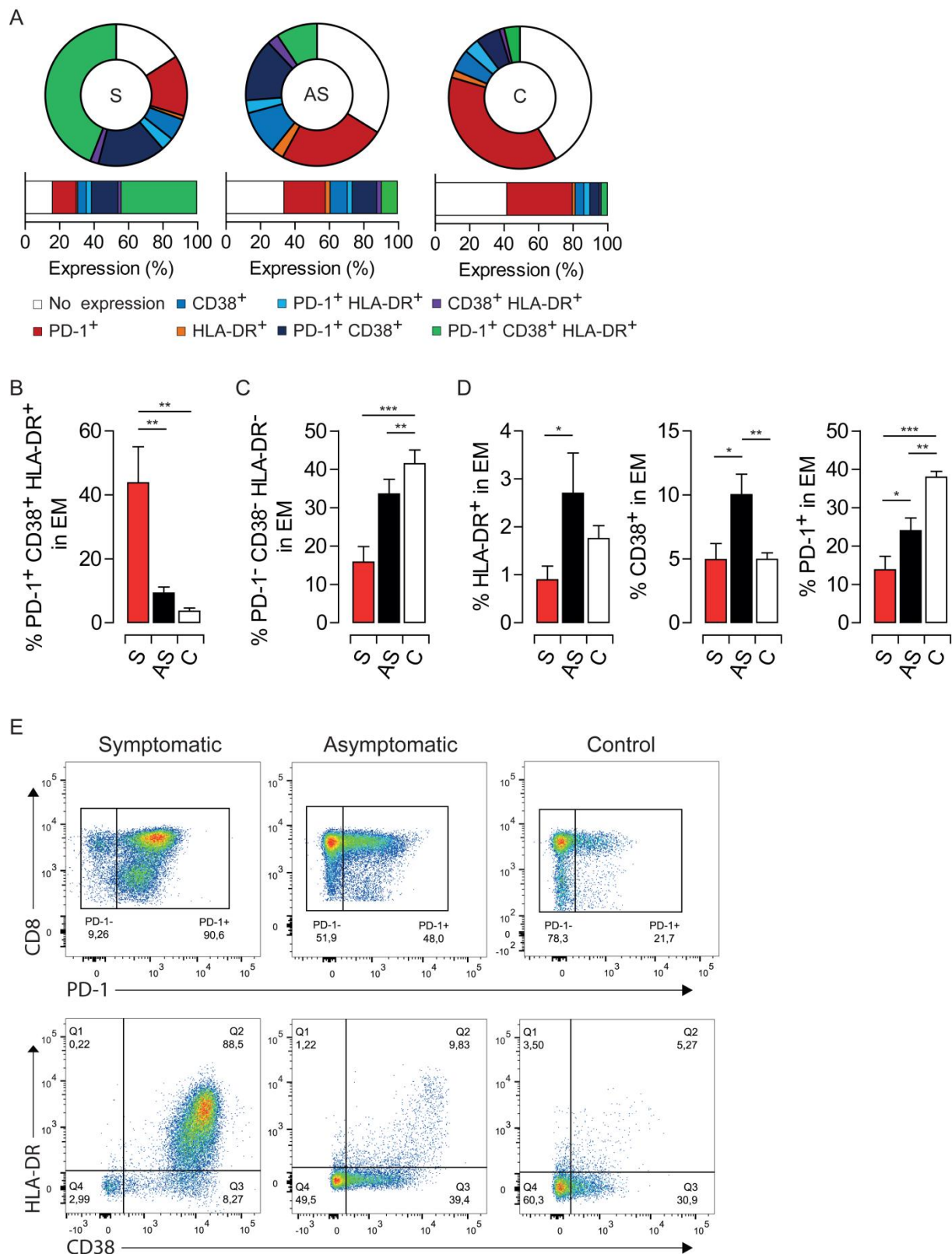


FIG. 2. HEV-3 symptomatic patients harbor sizeable proportion of highly activated EM CD8 T cells coexpressing HLA-DR, CD38 and PD-1.

Symptomatic and asymptomatic patients, and healthy controls are represented on the graphs by S (red), AS (black) and C (white) respectively. (A) Donut chart representing the mean

percentage of cells identified by single/double/triple expression patterns or absence (no expression) of PD-1, HLA-DR and CD38. (B), (C) and (D) Bar graphs representing statistical analysis of the donut charts. (E) Representative dot plot for HLA-DR, CD38 and PD-1 coexpression in EM CD8 T cells. EM CD8 T cells were segregated based on PD-1 expression. CD38 and HLA-DR expression were illustrated in PD-1⁺ cells. Data represent mean values±S.E.M. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

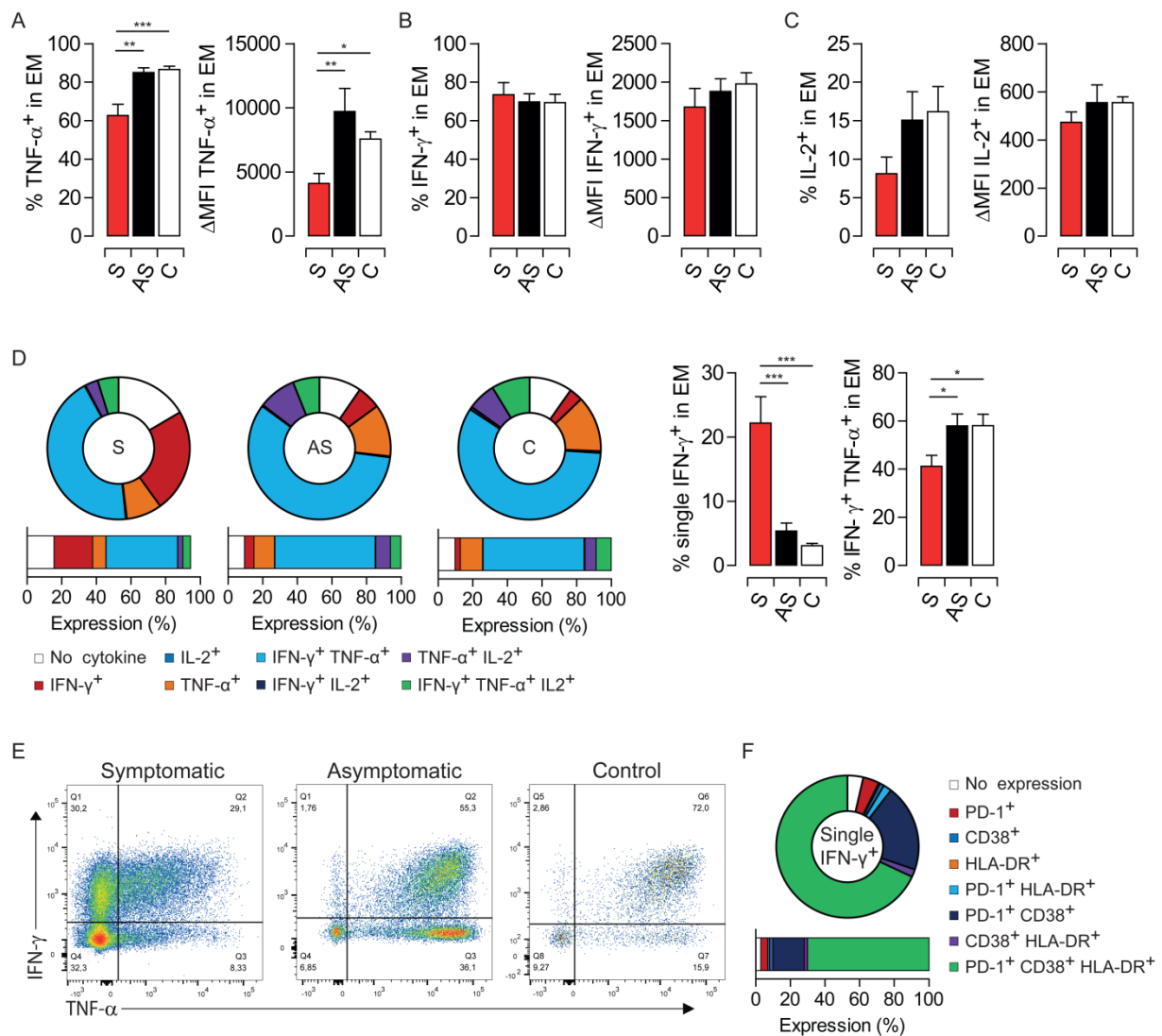


FIG. 3. Impairment of type-1 cytokine profile is associated with high activation status of EM CD8 T cells from HEV-3 symptomatic patients.

Symptomatic and asymptomatic patients, and healthy controls are represented on the graphs by S (red), AS (black) and C (white) respectively. (A-C) illustrate the proportion of EM CD8 T cells producing (A) TNF- α , (B) IFN- γ and (C) IL-2. Left panels show the frequency of EM CD8 T cells producing TNF- α , IFN- γ and IL-2. Right panels show geometric Mean Fluorescence Intensity of these cytokines in EM CD8 T cells calculated relatively to the negative staining of each cytokine in the same cell subset (Δ MFI). (D) Donut chart representing the mean percentage of cells identified by single/double/triple expression patterns or absence (no cytokine) of IFN- γ , TNF- α and IL-2 (left panel). Bar graphs represent statistical analysis of the donut charts (right panel). (E) Representative dot plot for IFN- γ and TNF- α production in EM CD8 T cells. (F) Donut chart representing the mean percentage of

cells expressing different combination of HLA-DR, CD38 and PD-1 in EM monofunctional IFN- γ producing cells. Data represent mean values \pm S.E.M. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

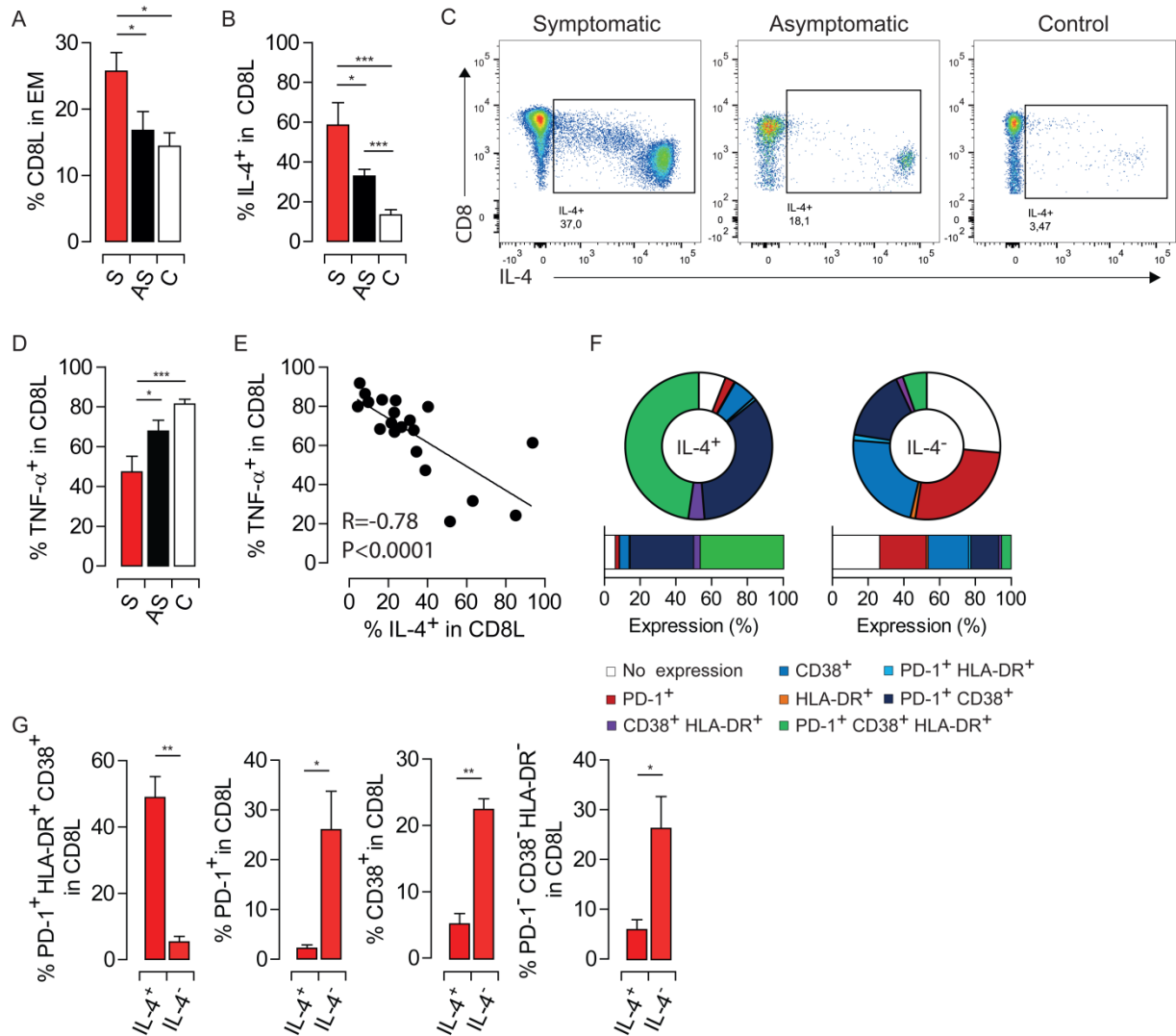
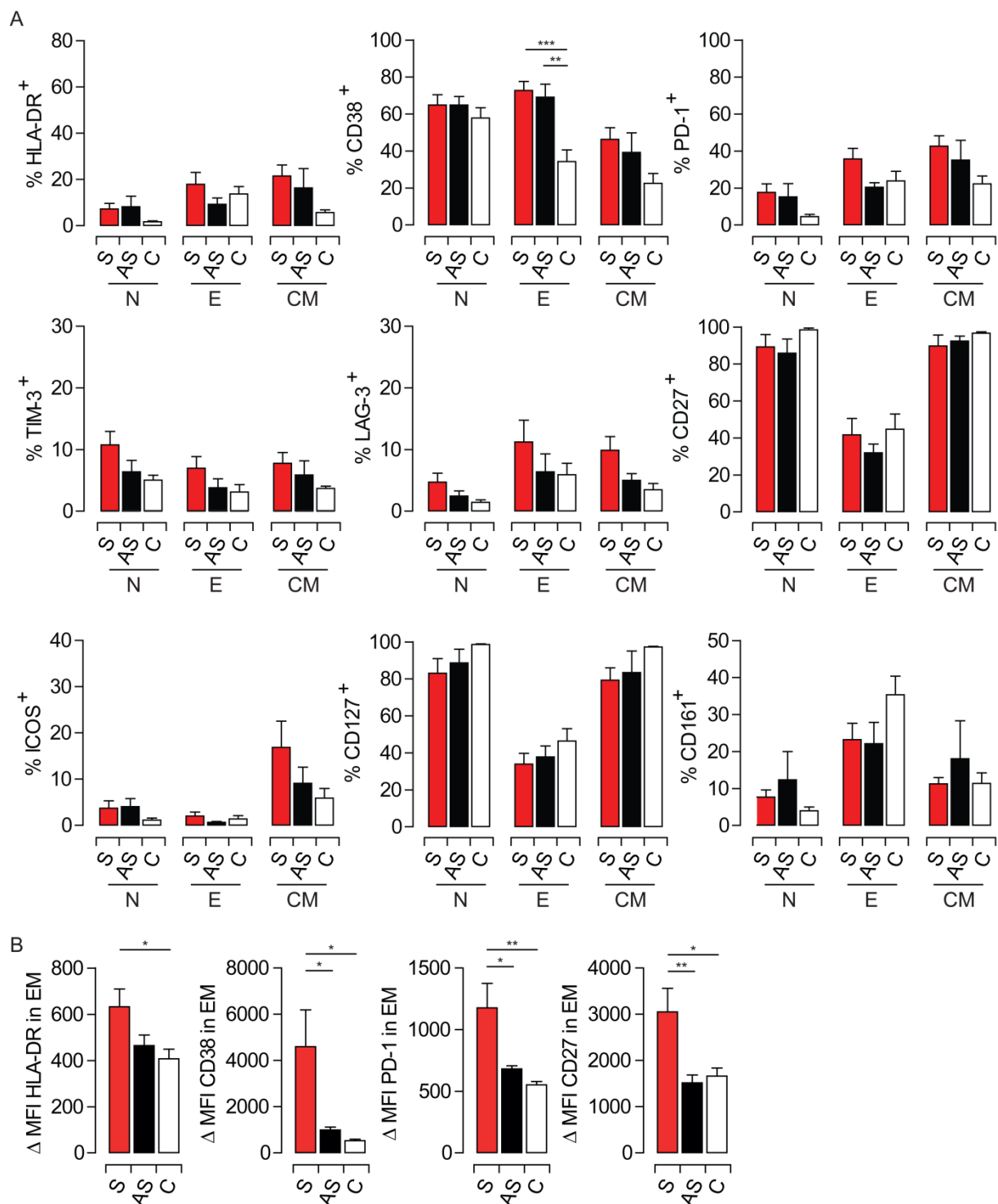


FIG. 4. Accumulation of a highly activated type-2-polarized EM CD8 subset producing IL-4 characterize symptomatic HEV-3 infections.

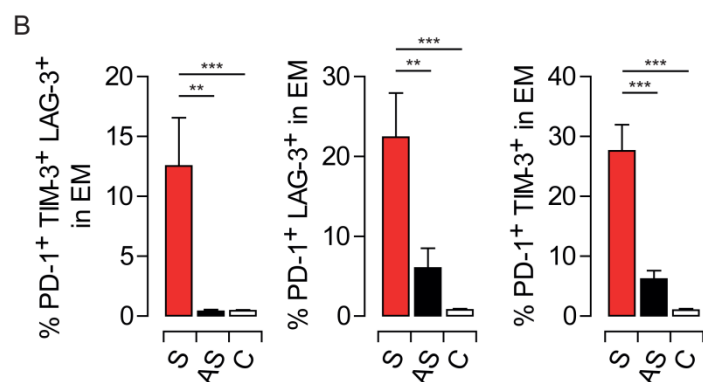
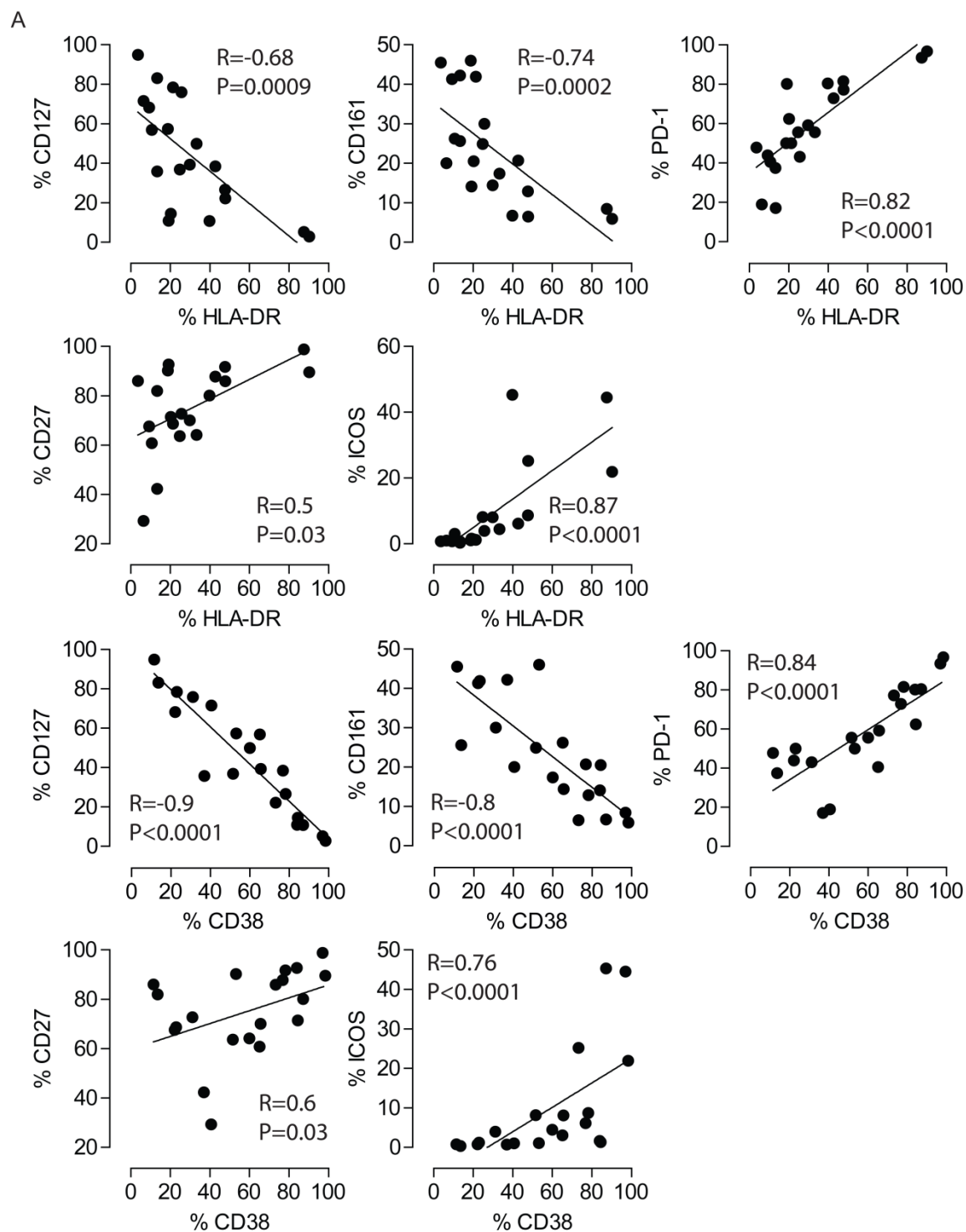
Symptomatic and asymptomatic patients, and healthy controls are represented on the graphs by S (red), AS (black) and C (white) respectively. (A) Proportion of CD8 low subset (CD8L) within the EM compartment. (B) Mean percentage of cells producing IL-4 in CD8L. (C) Representative dot plot of IL-4 staining in the EM CD8 T cell compartment. (D) Mean percentage of cells producing TNF-α in CD8L. (E) Correlation between TNF-α and IL-4 productions in EM CD8L cells. (F) Donut chart representing the mean percentage of cells identified by single/double/triple expression patterns or absence (no expression) of HLA-DR, CD38 and PD-1 in CD8L cells producing IL-4 (IL-4⁺) or not (IL-4⁻) in S patients. (G) Bar graph representing statistical analysis of donut charts. The Spearman correlation test P value and R coefficient are indicated in the graph. Data represent mean values±S.E.M. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.



SUPPORTING FIG. S1. Phenotype of CD8 T cell subset during HEV infection.

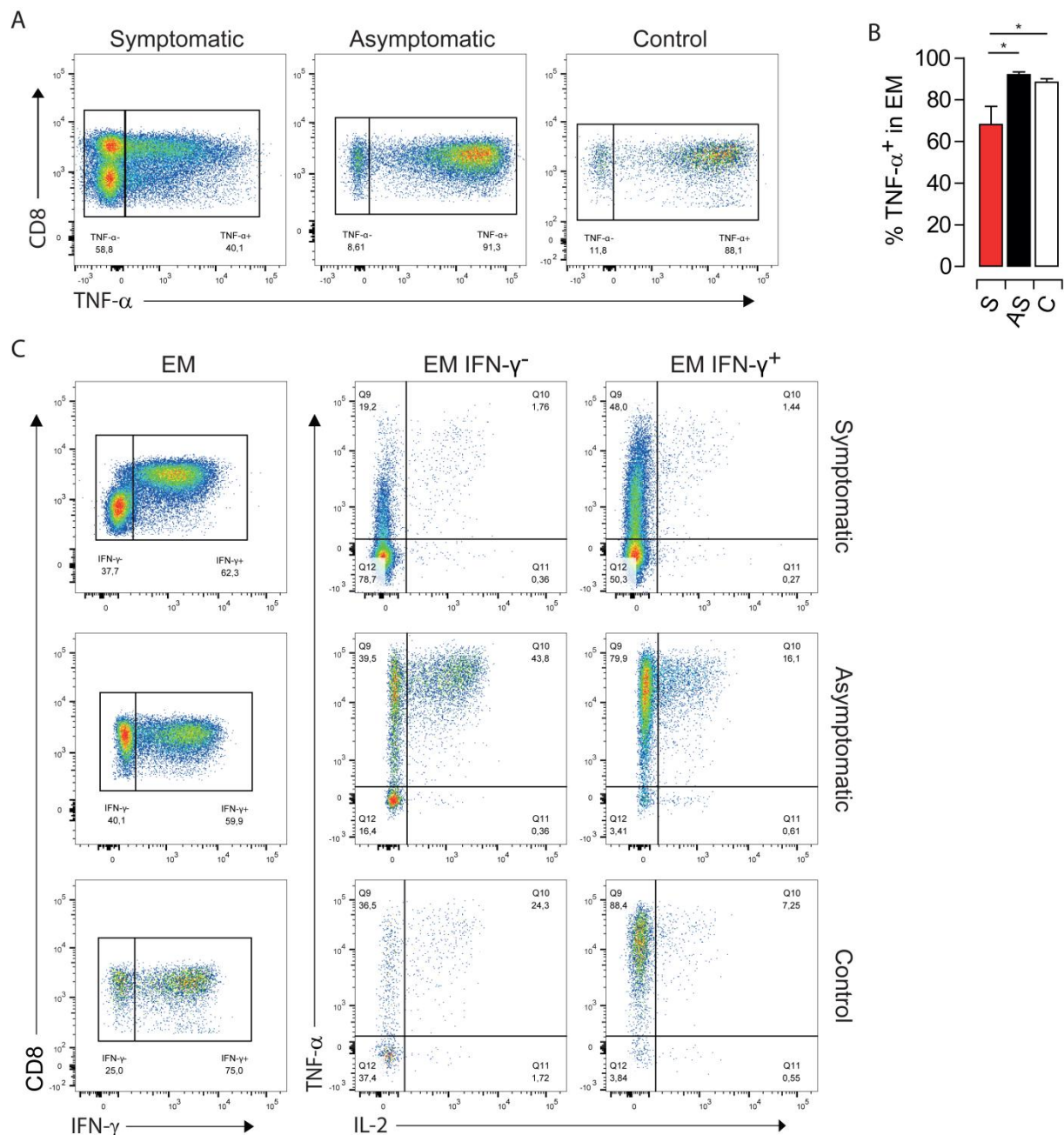
Symptomatic and asymptomatic patients, and healthy controls are represented on the graphs by S (red), AS (black) and C (white) respectively. (A) Percentage of cells expressing HLA-DR, CD38, PD-1, TIM-3, LAG-3, CD27, ICOS, CD127 and CD161 in CD8 T subsets: Naïve (N), Effector (E) and Central Memory (CM). (B) Geometric Mean Fluorescence Intensity of indicated markers staining in effector memory (EM) CD8 T cells calculated relatively to the

negative staining for the concerned marker (Δ MFI). Data represent mean values \pm S.E.M.
*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.



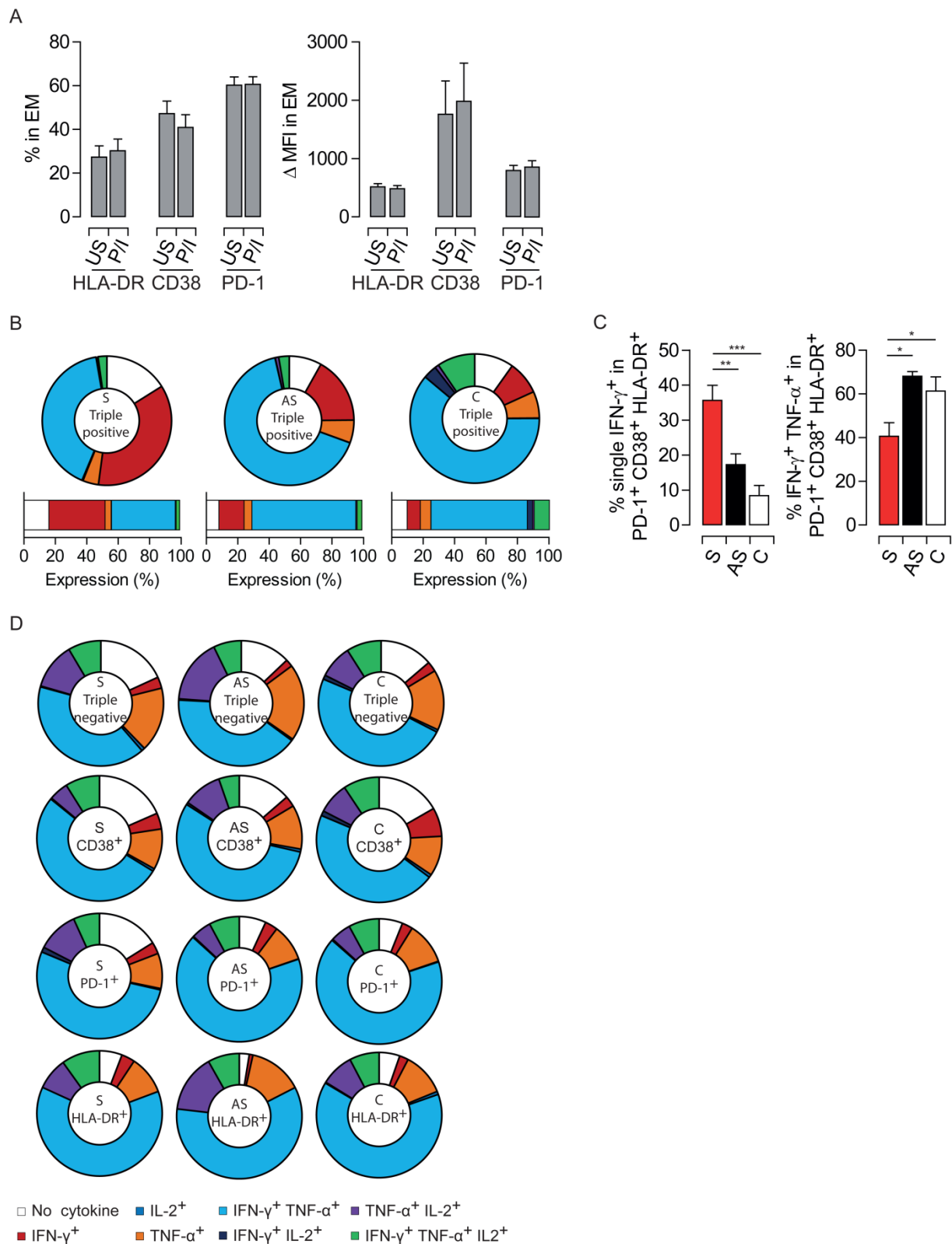
SUPPORTING FIG. S2. Correlation between phenotypic changes and activation status in EM CD8 T cells.

Symptomatic and asymptomatic patients, and healthy controls are represented on the graphs by S (red), AS (black) and C (white) respectively. (A) Correlation between the percentage of cells expressing CD38 or HLA-DR and CD127, CD161, PD-1, ICOS or CD27. (B) Percentage of EM CD8 T cells coexpressing PD-1 with TIM-3, and/or LAG-3. The Spearman correlation test P value and the R coefficient are indicated in each graph. Data represent mean values \pm S.E.M. **P<0.01; ***P<0.001.



SUPPORTING FIG. S3. Type-1 cytokine profile production in EM CD8 T cells.

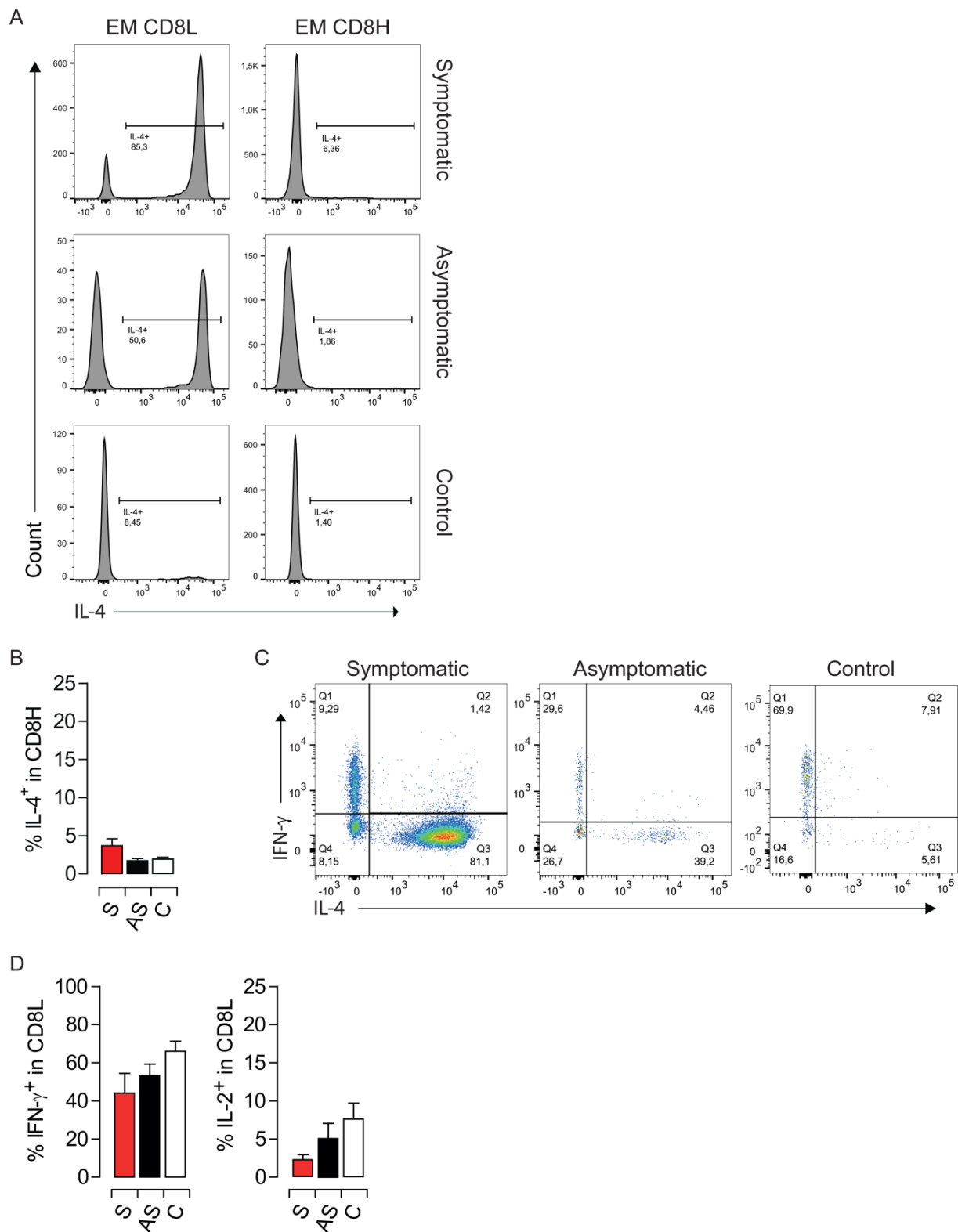
Symptomatic and asymptomatic patients, and healthy controls are represented on the graphs by S (red), AS (black) and C (white) respectively. (A) Representative dot plots for TNF- α production in EM CD8 T cells. (B) Representative gating for IFN- γ , TNF- α and IL-2 coexpression in EM CD8 T cells. EM CD8 T cells were separated based on IFN- γ expression. TNF- α and IL-2 expression were then analyzed in IFN- γ ⁺ and IFN- γ ⁻ cells. The cytokine profiles in EM CD8 T cells were calculated according to the frequency of grand-parents in each quadrant (Q9-Q12). (C) Mean percentage of EM CD8 T cells producing TNF- α after overnight stimulation. Data represent mean values \pm S.E.M. *P<0.05.



SUPPORTING FIG. S4. Association between type-1 cytokine production and activation status of EM CD8 T cells.

Symptomatic and asymptomatic patients, and healthy controls are represented on the graphs by S (red), AS (black) and C (white) respectively. (A) Percentage of cells expressing PD-1,

CD38 or HLA-DR (left panel) and the geometric Mean Fluorescence Intensity (Δ MFI) of these markers (right panel) in unstimulated (US) or PMA/Iono stimulated EM CD8 T subset. (B) and (D) Donut chart representing the mean percentage of cells expressing different combination of IFN- γ , TNF- α and IL-2 in EM CD8 T cells identified by single or triple (Triple positive) expression or absence (Triple negative) of PD-1, HLA-DR and CD38. (C) Bar graphs representing statistical analysis of donut chart from triple positive cells. Data represent mean values \pm S.E.M. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.



SUPPORTING FIG. S5. Phenotypic and functional analysis of EM CD8L T cells.

Symptomatic and asymptomatic patients, and healthy controls are represented on the graphs by S (red), AS (black) and C (white) respectively. (A) Representative histograms of IL-4 production in CD8 EM cells expressing high (CD8H) or low (CD8L) levels of CD8. (B)

Mean percentage of IL-4 producing cells in the CD8H subset. (C) Representative dot plots of IFN- γ and IL-4 expression in CD8L cells. (D) Mean percentage of IFN- γ and IL-2 producing cells in CD8 L subset. Data represent mean values \pm S.E.M.

Discussion

Mes travaux de thèse se situent à l'interface entre la grossesse, les infections virales et la réponse immune. Ils ont participé à définir le tropisme des virus de l'hépatite E (VHE) et Zika (ZIKV) à l'interface materno-fœtale. Ces virus sont responsables de pathologies placentaires et fœtales par des mécanismes distincts qui ont des conséquences dévastatrices sur la mère et son enfant. A ce titre, ils peuvent être rattachés aux autres pathogènes de la famille des TORCH. En plus de ces travaux, nous avons également initié une étude sur l'importance de la réponse immune dans le contrôle des infections, chez la femme enceinte et les personnes âgées. Enfin, nos travaux sur le microenvironnement cytokinique soulignent l'importance d'une régulation fine des fonctions effectrices des cellules NK, mais suggèrent également que ces fonctions peuvent être modulées à souhait. Les conséquences des infections virales sur ce microenvironnement ne sont actuellement pas connues mais ouvrent de nouvelles perspectives de recherche.

A. Transmission du ZIKV à l'interface mère-fœtus durant le premier trimestre de grossesse

Durant nos travaux, nous avons étudié parmi les premiers à définir le large tropisme de la souche Asiatique du ZIKV à l'interface mère-fœtus. Nous avons montré que le ZIKV infecte la décidua et cible des cellules cardinales de ce tissu, tout particulièrement les cellules stromales (DSC) et les macrophages (dM) [967]. Cela suggère que la décidua pourrait servir de site privilégié pour la réplication du virus avant sa dissémination au fœtus. De plus, ces cellules ont un rôle important durant la grossesse car elles sont essentielles à l'homéostasie tissulaire, au remodelage vasculaire décidual et participent à la mise en place d'un microenvironnement favorable au développement placentaire [652,1013,1014]. Ainsi, l'infection et la forte réplication du ZIKV dans ces cellules pourrait non seulement favoriser sa dissémination au fœtus mais également limiter leurs fonctions auxiliaires durant la grossesse [1015]. Enfin, nous avons prouvé que le virus produit dans la décidua est capable d'infecter les cellules du placenta fœtal, suggérant une transmission possible au fœtus *via* les villosités placentaires ancrées.

Nous avons également observé que le ZIKV est capable d'infecter le placenta et de causer des dommages tissulaires. Ces résultats sont en accord avec d'autres études publiées durant la même période qui montraient que le placenta est permissif à l'infection par le ZIKV durant le premier trimestre de grossesse mais devient résistant durant le troisième trimestre [113,968]. Par des approches de microscopie confocale, nous avons pu établir que le ZIKV est capable d'infecter les différents types cellulaires qui constituent la barrière placentaire (CTV, STB) mais aussi les cellules de Hofbauer (macrophages fœtaux). Le virus étant

présent dans le sang maternel, qui baigne les villosités flottantes, il est envisageable que le ZIKV puisse traverser la barrière placentaire pour se transmettre au fœtus.

Ainsi, nos travaux sur le ZIKV suggèrent deux modes de transmission au fœtus :

- 1) Par une voie trans-placentaire, où le virus remonte le long des villosités ancrées après s'être massivement répliqué dans la *decidua basalis*,
- 2) Par une voie hématogène, où le virus présent dans le sang maternel traverse la barrière placentaire pour accéder à la circulation fœtale.

L'importance relative de chacune de ces voies de transmission dans la pathogenèse virale *in vivo* n'est pas connue et difficilement étudiable. Cependant, les grandes quantités de virus produites par les explants déciduaux et retrouvées dans le sang maternel suggèrent que ces deux voies sont probablement toutes les deux importantes.

Il sera maintenant important d'étendre nos résultats en utilisant la souche Africaine du ZIKV. Les travaux de l'équipe de Lenore Pereira indiquent que cette souche est également capable d'infecter le placenta, même si rien n'est connu sur son tropisme décidual [968,972]. Cependant, le fait que seule la souche Asiatique soit associée aux pathologies de la grossesse suggère une pathogenèse différente de la souche Africaine. Il est également possible que, comme observé pour le neurotropisme, l'apparition de mutations dans la souche Asiatique du ZIKV se traduise par un meilleur tropisme placentaire [928]. Le fait que la souche Asiatique infecte plus les CTEV et les cellules de Hofbauer que la souche Africaine pourrait être un argument en faveur de cette hypothèse [972].

Enfin, nous avons découvert que le cordon ombilical et plus particulièrement les cellules souches mésenchymateuses sont infectables par le ZIKV et permettent une forte réplication virale [967]. Les trophoblastes de la barrière placentaire étant infectables par le ZIKV, il est possible que le virus ait accès au cordon ombilical par la circulation fœtale ou par le liquide amniotique dans lequel baigne le fœtus. En accord avec cette hypothèse, il a été montré que le ZIKV était retrouvé dans le liquide amniotique de patientes infectées dont le fœtus avait développé une microcéphalie [950]. Les conséquences de l'infection des cellules souches mésenchymateuses par le ZIKV sont encore inconnues. Cependant, il est connu que ces cellules ont un potentiel multi-lignage qui leur permet de se différencier en neurone, en chondrocyte, en ostéoblaste ou en cardiomyocyte en fonction de leur environnement [1016]. Ainsi, de la même manière qu'il bloque la différenciation des progéniteurs neuraux, il est possible que le ZIKV inhibe la différenciation de ces cellules, ce qui pourrait expliquer certains défauts neuro-développementaux observés lors de l'infection congénitale [978]. Il serait alors important de tester la capacité de ces cellules à se différencier en différents lignages après infection pour explorer cette possibilité.

B. Transmission du VHE à l'interface mère-fœtus

De la même manière que nous avons étudié le ZIKV, nous avons voulu étendre notre modèle *ex vivo* au VHE. Cependant, à la différence du ZIKV, le VHE est un virus particulièrement difficile à cultiver. Au moment où nous avons commencé notre étude, seulement des modèles cellulaires *in vitro* existaient et utilisaient majoritairement des lignées tumorales [807,900]. De plus, ces modèles nécessitent un long temps de culture (>30 jours) et l'ajout régulier de cellules fraîches pour obtenir de forts titres viraux, même en utilisant des souches adaptées en laboratoire. De plus, même avec les souches adaptées et après 30 jours de culture, le pourcentage d'infection reste faible (<10%). Malgré ces limitations, nous avons réussi à modéliser *ex vivo* l'infection par le VHE et avons comparé la pathogenèse associée aux différents génotypes viraux (**Figure 59**). Ainsi, nous avons prouvé que le VHE-1, et dans une moindre mesure le VHE-3, est capable d'infecter les explants tissulaires de decidua et le placenta afin de s'y répliquer. Cette observation a également été confirmée par hybridation *in situ* de l'ARN du VHE dans les différents tissus. De plus, nous avons montré que les cellules stromales déciduales et placentaires permettent la réplication du VHE (virus originel ou produit par les explants), avec également un meilleur tropisme du VHE-1 par rapport au VHE-3.

Nous avons cependant dû faire face à des difficultés inhérentes à notre modèle. En effet, les tissus et les cellules primaires ne peuvent pas être maintenus en culture pendant plus de quinze jours, ce qui est relativement incompatible avec le long temps nécessaire à l'amplification du VHE. Cependant, même si nous n'avons pu étudier la réplication virale que durant un temps plus court, nous avons quand même été capables d'observer des différences entre le VHE-1 et le VHE-3. De plus, la ribavirine inhibe cette réplication. Cela confirme que même si la production virale dans les explants n'est pas très élevée, elle est spécifique et les différences observées entre le VHE-1 et le VHE-3 sont pertinentes.

Une autre difficulté à laquelle nous avons été confronté est le faible pourcentage d'infection des cellules. En effet, après sept jours de culture, nous n'avons pu observer que 2% et 3,5% de cellules infectées au maximum pour les cellules stromales primaires et la lignée HepG2/C3A respectivement. Cependant, malgré ce faible pourcentage d'infection, nous avons quand même pu observer des différences entre le VHE-1 et le VHE-3 et avons pu confirmer l'infection des cellules stromales par microscopie confocale. En accord avec nos données de qRT-PCR sur la production virale, nous avons pu confirmer que le VHE-1 a un meilleur tropisme pour les cellules stromales. Au contraire le VHE-3 a un meilleur tropisme pour la lignée HepG2/C3A, qui est très peu infectable par le VHE-1. En plus des cellules stromales, notre analyse par hybridation *in situ* suggère également que les trophoblastes

sont également infectables par le VHE. Cette possibilité est également supportée par une étude récente qui a montré la susceptibilité d’une lignée de choriocarcinome à l’infection [905].

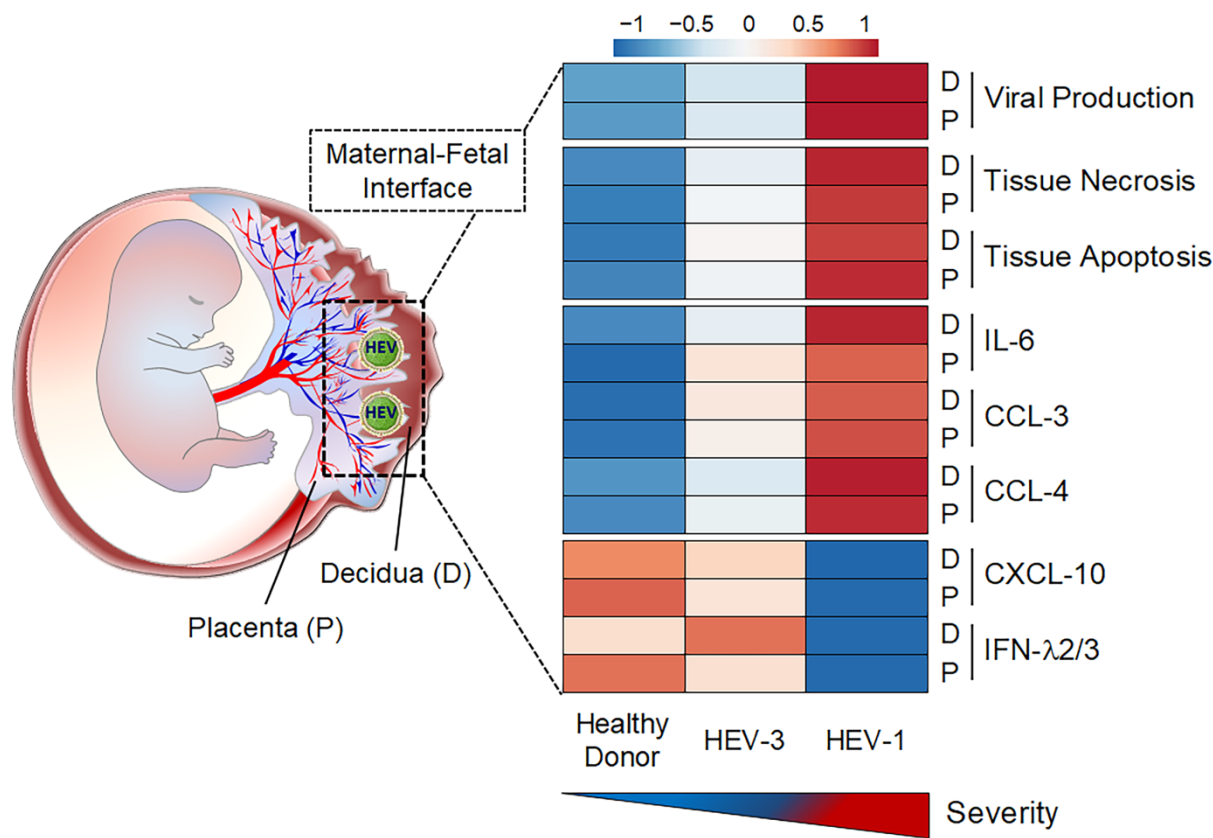


Figure 59 : Pathogénicité génotype-dépendante du VHE à l’interface mère-fœtus.

Etant en contact avec le sang maternel, l’interface materno-fœtal est constamment exposé aux particules virales qui circulent dans le sang après consommation d’un aliment contaminé ou la libération de virions par les hépatocytes infectés [749]. Ainsi, de manière similaire au ZIKV, le VHE pourrait également se transmettre au fœtus par une voie hématogène. Le fait que les femmes enceintes faisant des hépatites fulminantes aient une charge virale plus élevée dans le sang est en accord avec cette hypothèse et la renforce [866]. Le virus se répliquant également la décidua, une transmission trans-placentaire est également envisageable. Cependant, la réplication modérée du virus dans ce tissu suggère que, même si elle existe, cette voie serait moins importante pour la transmission verticale du VHE. En revanche, les conséquences de l’infection de ce tissu pourraient jouer un rôle majeur dans la sévérité de la pathologie maternelle et fœtale.

Depuis la découverte de la réplication extra-hépatique du VHE, peu d’études s’étaient intéressées au tropisme de l’infection à l’interface mère-fœtus [863,905]. Ainsi, nos travaux sont les premiers à modéliser la transmission du VHE dans la décidua et le placenta en utilisant un modèle *ex vivo* de tissus et cellules primaires. De plus, ces travaux pionniers

nous ont permis, en utilisant des souches cliniques du VHE, de prouver que le VHE-1 a un meilleur tropisme que le VHE-3 à l'interface mère fœtus mais aussi des conséquences plus graves (**Figure 59**). Cependant, ces résultats doivent maintenant être élargis à d'autres souches virales du VHE-1 ou du VHE-3 mais également à d'autres génotypes tels que le VHE-2 et le VHE-4. Enfin, il sera essentiel d'élargir nos observations et de caractériser l'impact de l'infection au troisième trimestre de grossesse, période durant laquelle l'infection par le VHE a été décrite comme étant la plus grave.

C. Perturbations du microenvironnement local lors des infections virales

Durant nos travaux, nous avons porté une attention toute particulière aux conséquences des infections virales sur le microenvironnement local. Nous avons ainsi étudié la sécrétion de différentes cytokines, chimiokines, facteurs de croissance et MMP. L'ensemble de nos travaux suggère de grandes différences dans les conséquences de l'infection de l'interface mère-fœtus entre le ZIKV et le VHE.

L'ensemble de nos travaux sur le secrétome placentaire lors de l'infection par le ZIKV montrent que le virus a un impact majeur sur la fonction sécrétrice de ce tissu (**Figure 60**). Indépendamment du niveau d'infection, l'infection par le ZIKV est associée à une diminution de la sécrétion de nombreuses chimiokines (CCL-3, CCL-4, CXCL-1, CXCL-10 et CXCL-12), facteurs de croissance (M-CSF, G-CSF, GM-CSF et VEGF-A) mais aussi de MMP-9. En revanche, l'infection ne modifie pas la sécrétion d'IL-6, dont le niveau augmente classiquement lors des infections virales et notamment après infection par le HCMV [1017]. Compte tenu le rôle central des chimiokines dans la régulation et le maintien de l'interface materno-fœtale, la dérégulation massive causée par le ZIKV pourrait avoir des conséquences dramatiques durant la grossesse [1018]. Par exemple, CCL-3 et CCL-4 permettent l'attraction de cellules exprimant les récepteurs CCR1 et CCR5 parmi lesquelles on retrouve les cellules NK, les macrophages et les LT ; qui sont toutes des populations essentielles au remodelage vasculaire utérin et au maintien de la tolérance fœtale. De plus, le CXCL-12 produit par les trophoblastes est également essentiel au recrutement de cellules NK CD56^{bright} depuis la périphérie [659]. Enfin, le CXCL-10 est essentiel à la migration et à l'invasion des trophoblastes lors de l'ancrage du placenta et du remodelage vasculaire utérin [665]. En plus de ces nombreuses chimiokines, l'infection inhibe également la sécrétion de VEGF-A et de MMP-9 qui régulent l'angiogenèse et la dégradation de la MEC respectivement.

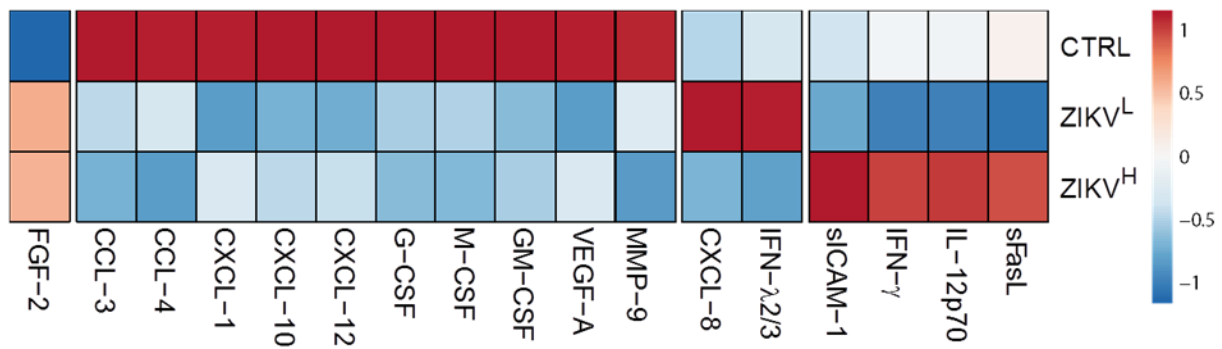


Figure 60 : Heatmap résumant les altérations du sécrétome des explants placentaires.

L'altération de la sécrétion de différents facteurs de croissance des macrophages (M-CSF et GM-CSF) suggère également une perturbation de l'homéostasie et/ou de la fonction de ces cellules. En accord avec cette hypothèse, une hyperplasie des cellules de Hofbauer a été observée *in utero* dans des placentas de femmes enceintes infectées par le ZIKV [1019]. Cette hyperplasie des cellules de Hofbauer pourrait alors faciliter le transfert du virus de la mère vers le fœtus. Cependant les conséquences de cette hyperplasie sur la fonction de ces cellules ne sont pas connues et nécessitent une étude approfondie. De même il sera intéressant d'étudier les conséquences de la déprivation en facteurs de croissance (M-CSF, G-CSF, GM-CSF) sur le phénotype (M1 vs M2) et les fonctions (inflammatoires vs régulateurs) des dM pour mieux comprendre l'importance de leur dérégulation dans la pathogenèse du ZIKV.

Ainsi, l'ensemble de ces données suggère que le ZIKV bloque les processus d'invasion trophoblastiques et de remodelage des artères spiralées maternelles. Un défaut dans ces processus durant le premier trimestre de grossesse est à l'origine de pathologies telles que la pré-éclampsie ou le retard de croissance *in utero*, qui sont des pathologies caractéristiques de l'infection congénitale par le ZIKV [925]. La sécrétion augmentée de FGF-2 pourrait alors représenter un mécanisme de compensation visant à limiter l'impact de la diminution de la production de VEGF-A.

L'analyse différentielle, en fonction du niveau de réplication virale dans les explants placentaires, nous a permis de montrer qu'une infection productive des explants (ZIKV^H vs ZIKV^L) est associée à la production de grande quantité de sICAM-1, de sFasL, d'IFN-γ et d'IL-12. L'ensemble de ces facteurs solubles peuvent être reliés à une réponse pro-Th1 et à un état inflammatoire. En effet, sICAM-1 est un marqueur associé à l'inflammation vasculaire [1020]. De plus il a été montré que la sécrétion de la forme soluble de FasL par les trophoblastes est responsable d'une apoptose des cellules immunes [1021]. Ainsi, dans les explants ZIKV^H, les défauts d'invasion mais aussi un shift vers un profil pro-Th1 et une rupture de la tolérance immune pourraient agir de concert et être à l'origine des pathologies

placentaires observées chez la femme enceinte. Dans les explants ZIKV^L, le niveau de sICAM-1, de sFasL, d'IFN- γ et d'IL-12 reste inchangé. Par ailleurs, la forte augmentation de la sécrétion de CXCL-8, uniquement dans les tissus ZIKV^L, pourrait témoigner de la mise en place d'un mécanisme de compensation par le placenta pour contrebalancer la baisse de CXCL-10, une chimiokine impliquée dans l'attraction des trophoblastes [665]. Ainsi il semblerait que le niveau d'infection des explants placentaires par le ZIKV ait un impact direct sur la pathogenèse de l'infection. En effet, même si le ZIKV cause systématiquement un défaut de sécrétion de facteurs solubles pro-invasifs et pro-angiogénique, l'exacerbation de la pathogenèse et la forte production virale dans les explants ZIKV^H pourraient être responsables du déclenchement de la pathologie placentaire. Au contraire, dans les explants ZIKV^L, l'absence d'exacerbation additionnée à la faible réplication virale et des mécanismes compensatoires pourraient être suffisants à préserver un développement placentaire normal et à protéger le fœtus. Il est clair qu'une analyse comparative de tissus issus de grossesses saines et pathologiques, en particulier de leur état de vascularisation et de leur degré d'invasion trophoblastique, permettraient de valider nos observations *ex vivo*. De plus, afin de confirmer le rôle des différents facteurs solubles dans la pathogenèse du ZIKV, il sera important de pouvoir tester les mêmes facteurs solubles en utilisant la souche Africaine du virus qui est sans conséquences sur la grossesse. Ainsi, un tel criblage pourrait nous permettre d'identifier des facteurs solubles cliniquement relevant et fortement associés à la pathogenèse virale, dans le but de développer de nouvelles approches thérapeutiques. Enfin, l'ultime confirmation de la pathogenèse différentielle des explants ZIKV^H et ZIKV^L sera de comparer *in vivo* leurs capacités invasives et angiogéniques. Pour cela, nous utiliserons un modèle de souris immunodéficiences dans lesquelles nous injecterons des explants ZIKV^H et ZIKV^L sous la capsule rénale, et dont nous suivrons le développement au cours du temps. L'utilisation de ce type de modèle a déjà permis de montrer que les explants infectés par le HCMV présentaient un défaut d'invasion mais aussi de remodelage vasculaire [1022]. Si notre hypothèse s'avère correcte, les explants ZIKV^H auront des capacités invasives grandement réduites alors que les explants ZIKV^L n'auront que peu ou pas de défauts d'invasion.

A la différence du ZIKV, les perturbations du secrétome décidual et placentaires causées par le VHE sont majoritairement pro-inflammatoires. En effet, le virus est responsable d'une augmentation massive de la sécrétion d'IL-6, de sICAM-1, de CCL-3, de CCL-4 de G-CSF et de GM-CSF aussi bien dans les explants tissulaires que dans les cellules stromales. De plus, une partie de ces facteurs soluble est sécrétée plus fortement lors de l'infection par le VHE-1, par comparaison au VHE-3. Parmi ces facteurs solubles, on retrouve notamment l'IL-6, le CCL-3 et le CCL-4. L'IL-6 est une cytokine dont le niveau sérique augmente dans les

cas d'hépatites fulminantes causées par le VHE [856]. De plus, cette cytokine a également été associée à la pathogenèse de la pré-éclampsie mais aussi à la sévérité des hépatites fulminantes [1023,1024]. Ainsi, la forte sécrétion d'IL-6 par les tissus et les cellules infectés par le VHE-1 pourrait directement participer à l'exacerbation de la pathogenèse virale chez la femme enceinte. De plus, elle pourrait participer à la mise en place d'une inflammation locale qui, aidée par le CCL-3 et le CCL-4, favoriserait le recrutement de nouvelles cellules inflammatoires (monocytes, LT et cellules NK) qui participeraient à leur tour à l'exacerbation de la pathologie. Ces cellules étant recrutées de la périphérie, cette hypothèse n'est pas testable dans nos conditions expérimentales. Cependant, elle pourrait être testée *in vitro* dans un système de transwell en analysant la capacité migratoire de différentes populations immunes en présence d'explants tissulaires, infectés (VHE-1, VHE-3) ou non. Ainsi, nous pourrions confirmer le rôle des chimiokines dans la pathogenèse de l'infection. Enfin, il sera essentiel de confirmer nos observations *in vivo* en analysant et en comparant par histologie le placenta de grossesses saines et pathologiques (hépatites aiguës vs fulminantes) afin de vérifier si une telle infiltration immune est retrouvée à l'interface materno-fœtale. Si l'on se réfère aux données de la littérature concernant le foie, on peut s'attendre à un recrutement massif de cellules NK et LT CD8 [858]. Enfin, nous avons également observé une diminution de la sécrétion de CXCL-10 dans les explants de décidua et de placenta, uniquement après l'infection par le VHE-1. Cette chimiokine étant essentielle à l'attraction des trophoblastes, son inhibition spécifique par le VHE-1 pourrait également contribuer à la pathogenèse virale.

En conclusion, nos résultats sur le VHE suggèrent la mise en place d'un état inflammatoire local durant le premier trimestre de grossesse. Il faudra maintenant confirmer ces observations en utilisant des explants du terme de la grossesse, et les renforcer en testant de nouvelles souches cliniques du VHE-1 et du VHE-3. Ce n'est malheureusement pas faisable à l'heure actuelle, notre laboratoire ne disposant que d'une seule souche de VHE-1. Il serait également important d'élargir notre étude afin de comprendre le rôle de différents médiateurs de l'inflammation et notamment les lipides bioactifs. Enfin, aux vues de nos résultats, l'infection de l'interface materno-fœtale par le VHE-1 est responsable d'un fort état inflammatoire, qui pourrait être, à son tour, à l'origine de fausses couches [1025]. Il est alors envisageable de penser que l'infection par le VHE durant le premier trimestre de grossesse pourrait être responsable de fausses couches, qui passeraient inaperçues dans les pays en voie de développement. Ainsi, la pathogenèse réelle du VHE-1 durant la grossesse serait grandement sous-estimée.

D. Altérations de l'architecture tissulaire lors des infections virales

En plus des altérations du sécrétome, nous avons également observé que l'infection par le ZIKV et le VHE sont responsables de nombreuses altérations de l'architecture tissulaire. Cependant, les mécanismes responsables de ces altérations semblent bien distincts, selon le virus considéré. Dans le cas du ZIKV, l'analyse des facteurs solubles n'a révélé que pas ou peu d'inflammation. Ainsi, les dommages tissulaires observés dans la décidua et le placenta sont probablement dus à l'effet cytopathique du ZIKV [1026]. Au contraire le VHE n'étant pas un virus lytique, l'état pro-inflammatoire induit par l'infection pourrait être à l'origine des dommages tissulaires observés.

L'étude des altérations tissulaires renforce nos observations sur la pathogenèse différentielle du VHE-1 et du VHE-3 à l'interface mère-fœtus. Ainsi, l'augmentation de l'apoptose et de la nécrose tissulaire observée lors de l'infection de la décidua et du placenta par le VHE-1 pourrait être responsable de la perte de l'intégrité de la barrière placentaire et de la dissémination du virus au compartiment fœtal. Nos résultats sont en accord avec les données de la littérature montrant des altérations tissulaires dans des biopsies hépatiques de patients infectés ou dans des modèles animaux [853,1027,1028]. Même si l'origine des dégâts tissulaires n'est pas connue, une étude récente a suggéré l'implication du métabolisme mitochondrial et de la voie des caspases [1028]. Ces dommages tissulaires doivent également être reliés à la dérégulation du sécrétome déciduaire et placentaire. Durant la grossesse, ce sécrétome est finement régulé pour permettre une implantation embryonnaire et une croissance fœtale optimales, tout en maintenant une tolérance immune envers le fœtus. Au contraire, une sécrétion non contrôlée, excessive et persistante de médiateurs inflammatoires a été incriminée dans les dommages tissulaires associés aux pathologies de la grossesse, notamment lors d'infections virales [652,1029-1031]. Ainsi, une dérégulation du microenvironnement local vers un profil pro-inflammatoire est responsable du recrutement mais aussi de l'activation de cellules immunes effectrices [1032,1033]. Ces cellules vont alors contribuer à la mise en place d'une boucle d'amplification qui renforcera l'inflammation locale mais également les dommages tissulaires et la propagation virale. Le fait que les milieux conditionnés d'explants tissulaires irradiés permettent de reproduire les dommages tissulaires souligne l'importance des facteurs de l'hôte dans la pathogenèse virale.

En conclusion, nos travaux montrent que le VHE-1, responsable de graves complications durant la grossesse, cible l'interface mère-fœtus et provoque une dérégulation majeure du microenvironnement cytokinique associée à des dommages tissulaires (**Figure 59**). L'infection par le VHE-3 n'étant associée à aucune complication de la grossesse, il est

possible que le niveau d'inflammation modéré que nous avons observé n'ait que de faibles conséquences et soit insuffisant pour causer une pathologie. Cela expliquerait pourquoi les rares cas documentés d'infection par le VHE-3 durant la grossesse sont sans conséquences [870-872]. Une autre hypothèse pourrait être un contrôle plus efficace de l'infection par le VHE-3 par le système immunitaire. Sachant le rôle clé des cellules dNK dans le contrôle d'infections virales telles que le HCMV ou le VIH au niveau de l'interface materno-fœtale, il est possible que ces cellules participent également au contrôle de l'infection virale par le VHE [669,685].

E. Rôle des IFN de type III dans le contrôle des infections congénitales

Un des objectifs de ce travail de thèse a été de caractériser et d'étudier les différences d'infectivité entre donneurs (ZIKV^H vs ZIKV^L) mais également entre génotypes viraux (VHE-1 vs VHE-3). Dans le cas du VHE, il est possible que des facteurs viraux dépendants du génotype puissent expliquer le tropisme préférentiel du VHE-1 à l'interface mère-fœtus. Parmi ces facteurs potentiels, il a récemment été décrit que le VHE-1 code pour protéine virale nommée ORF4 [801]. Cette protéine virale est spécifique du VHE-1 est induite en réponse à un stress du réticulum endoplasmique et permet une réplication virale plus importante. L'implication de cette protéine dans le contexte de la grossesse est cependant inconnue.

Un rôle des IFN de type I, II et/ou III pourrait également participer à expliquer les différences d'infectivités virales. Concernant le VHE, il a été montré que les protéines virales ORF1 et ORF3 sont capables d'inhiber la réponse immunitaire innée en bloquant la signalisation par RIG-I et les IFN de type I [784,886]. De plus, la production d'IFN et les ISG induits en réponse à l'infection par le VHE sont variables d'une étude à l'autre [876,877,883,905,1034,1035]. Ces différences peuvent s'expliquer par les conditions expérimentales mais aussi par les souches virales utilisées. Dans notre étude à l'interface materno-fœtale, nous n'avons pas pu observer de sécrétion d'IFN-I ou II quelque soit le génotype viral utilisé. En revanche, nous avons mis en évidence que la production virale du VHE-1 est inversement corrélée à la sécrétion d'IFN de type III et de l'ISG CXCL-10. De plus, nous avons montré que l'IFN- λ 2, et dans une moindre mesure l'IFN- λ 1, est capable d'inhiber la production virale du VHE-1 dans la décidua mais aussi dans le placenta. Ainsi, ces données suggèrent que le VHE-1 est capable de détourner la voie de l'IFN-III pour favoriser sa propre réplication. Cela pourrait permettre d'expliquer le meilleur tropisme et les conséquences plus graves du VHE-1 durant la grossesse. Afin de compléter ces résultats, il serait intéressant d'étudier plus finement le rôle des IFN durant la grossesse en caractérisant

les modifications des différentes ISG en réponse au VHE-1 et au VHE-3 pour définir plus précisément les facteurs responsables de la pathogenèse exacerbée de ce virus.

En plus du VHE, nous avons également étudié les IFN durant l'infection par le ZIKV. Nous n'avons cependant pas pu observer d'induction d'IFN-I ou d'IFN-II dans les explants placentaires. De manière intéressante, nous avons observé une forte augmentation de la production d'IFN- λ 2/3 dans les explants ZIKVL, qui nous laisse penser que la sécrétion d'IFN- λ 2/3 pourrait limiter la réplication virale dans ces explants. Cela devra cependant être confirmé en utilisant des anticorps bloquants. Il sera également intéressant de vérifier si la sécrétion de CXCL-8, qui pourrait être un mécanisme compensateur de la perte de CXCL-10, est dépendante de la sécrétion d'IFN- λ . Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature montrant que la sécrétion d'IFN- λ confère au placenta du troisième trimestre une résistance à l'infection par le ZIKV [113]. Dans le contexte de notre étude, il semblerait que l'IFN- λ 2/3 protège certains explants du ZIKV et limite les conséquences de l'infection. En revanche, nous n'avons pas encore pu identifier la raison pour laquelle seuls certains placentas vont avoir une induction d'IFN-III. Cependant, nous pouvons d'ores et déjà éliminer l'âge gestationnel car il ne permet pas de distinguer les placentas ZIKV^H et ZIKV^L.

En conclusion, nos données sur le VHE et ZIKV suggèrent un rôle protecteur des IFN- λ durant la grossesse. De plus, elles suggèrent que l'utilisation de ces molécules chez la femme enceinte pourrait permettre de limiter la pathogenèse associée à différentes infections virales pour les ramener à un niveau qui n'aurait aucune conséquence délétère. De plus, à la différence des IFN-I, l'effet protecteur des IFN- λ ne semble pas être associé à des conséquences délétères durant la grossesse [112]. Plusieurs études ont d'ores et déjà suggéré l'utilisation des IFN- λ dans différentes situations infectieuses, mais il faudra confirmer l'innocuité de ce traitement durant la grossesse [1036,1037].

F. Rôle des cellules dNK dans le contrôle des infections

Après avoir caractérisé la physiopathologie de l'infection par le ZIKV, nous avons voulu étudier le rôle des cellules NK dans le contrôle de l'infection. Nos résultats indiquent que l'infection par le ZIKV dans les cellules stromales déciduales (DSC) s'accompagne d'une augmentation progressive de l'expression de molécules de CMH-I classiques (HLA-A/B/C) et non classique (HLA-E). Ces données sont en accord avec les données de la littérature concernant d'autres types cellulaires [1000]. Nous avons également analysé l'expression de MICA et MICB mais nos résultats préliminaires suggèrent qu'ils ne sont pas modifiés lors de l'infection. En revanche, nous n'avons pas étudié le niveau d'expression des ULBP, autres ligands de NKG2D. Il faudra maintenant élargir cette étude pour pouvoir étudier l'ensemble

des ligands des récepteurs NK notamment ceux des NCR, impliqués dans le contrôle d'autres infections par les Flavivirus [519,520]. Cette étude sera faite en utilisant des récepteurs chimériques qui se fixeront à l'ensemble des ligands exprimés par les DSC [685]. Il sera également important d'étudier de HLA-F dont l'interaction avec le récepteur activateur KIR3DS1 permet le contrôle de l'infection par le VHC [1038]. En se basant sur nos données actuelles, l'interaction entre les DSC infectées et les cellules NK semble passer par les récepteurs de la famille des KIR et NKG2A/NKG2C. De plus, cette interaction permet d'augmenter le niveau d'activation des cellules NK (proportionnellement à l'augmentation du CMH-I) mais ne permet pas de déclencher les fonctions effectrices des cellules NK. Cela suggère un rôle des récepteurs activateurs (KIR-S, NKG2C) mais aussi des récepteurs inhibiteurs (KIR-L, NKG2A). Parmi les récepteurs activateurs de la famille des KIR, il serait notamment intéressant de s'intéresser au KIR2DS2 qui reconnaît des motifs conservés de l'hélicase virale de nombreux virus dont le ZIKV, présentés par le HLA-C [1039]. Le fait que nous n'observions aucun déclenchement des fonctions effectrices des cellules pNK pourrait indiquer que, comme suggéré précédemment, l'augmentation de HLA-I favorise les signaux inhibiteurs, constituant alors un mécanisme d'échappement viral [1000]. Le blocage spécifique des différents HLA permettra de confirmer cette possibilité. Une autre hypothèse pourrait être que les signaux activateurs induits ne sont pas assez forts pour déclencher les fonctions des cellules NK [1040]. Ainsi, d'autres signaux additionnels (cytokiniques ou cellulaires) induits par l'infection pourraient permettre de potentialiser la réponse des cellules NK pour la rendre protectrice.

Après avoir étudié le dialogue entre les cellules NK et les DSC infectées par ZIKV, nous avons voulu aller plus loin et vérifier le rôle des cellules dNK dans le contrôle de l'infection congénitale. Nos résultats nous ont permis de prouver que les cellules dNK permettent de limiter la production virale dans les DSC autologues infectées par l'intermédiaire de facteurs solubles et de manière précoce (**Figure 61**). Le fait que les cellules dNK inhibent efficacement la production virale, même en l'absence de contact avec les cellules cibles, suggère que le contrôle passe par la sécrétion de facteurs solubles constitutivement produits par les cellules dNK. Cependant, le fait que l'inhibition devienne optimale après contact suggère la production de ce/ces facteurs pourrait être augmentée lors de la reconnaissance des cellules infectées. Ainsi, la prochaine étape sera d'identifier ces facteurs solubles (screening par Luminex) et de confirmer leur rôle par des expériences de blocage et de complémentation. Parmi les candidats potentiels, nous aurons une attention toute particulière pour l'IFN- γ , une cytokine majoritairement produite par les cellules dNK. Cette cytokine a notamment été montrée comme étant essentielle au contrôle du VIH-1 par les cellules dNK [669]. En accord avec ces données, nos résultats montrent que cette cytokine

permet un contrôle efficace de la réplication virale dans les DSC et les dM, qui sont les principales cibles du virus à l'interface mère-fœtus. De manière intéressante, certains de nos résultats préliminaires (non présentés) montrent que l'infection des DSC par le ZIKV s'accompagne d'une augmentation de la sécrétion de CXCL-12. Sachant le rôle clé de cette chimiokine dans le recrutement des cellules NK CD56^{bright}, il est possible que l'infection de la décidua par le ZIKV s'accompagne également d'un recrutement massif de cellules pNK depuis la périphérie. Ce mécanisme renforcerait alors le contrôle de l'infection.

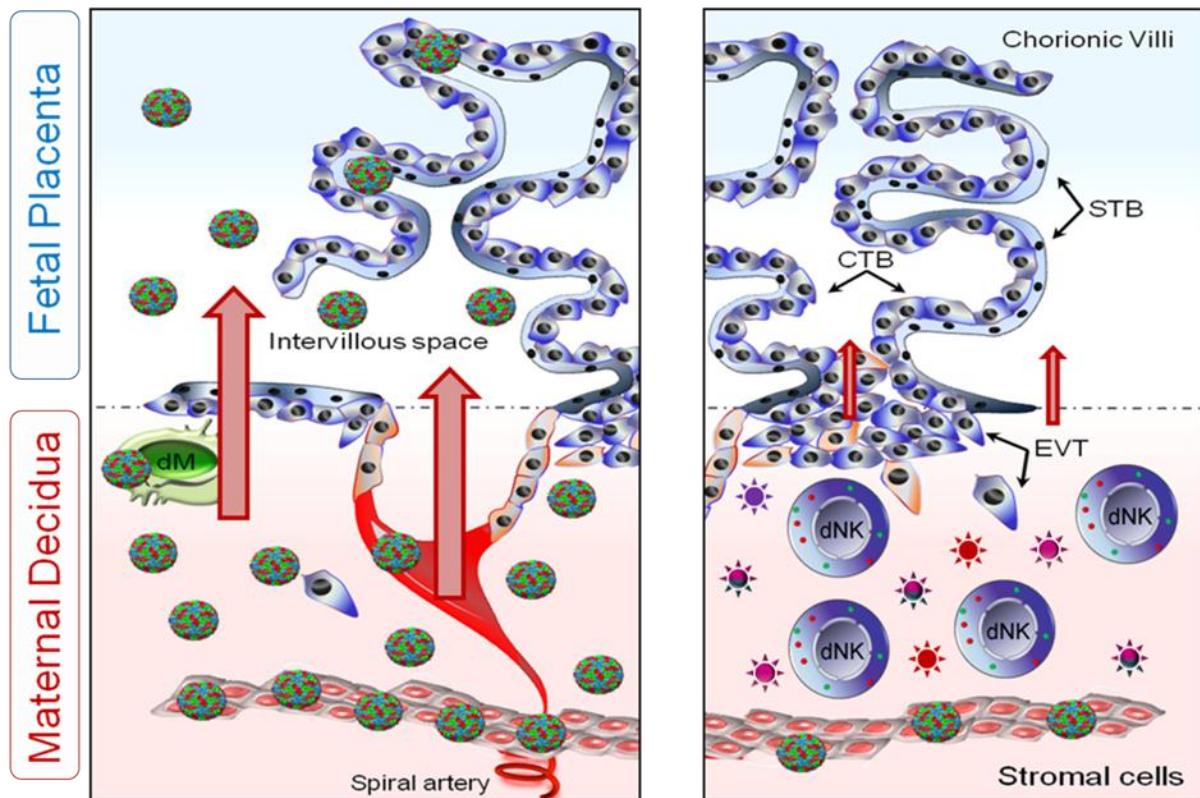


Figure 61 : Contrôle de la transmission materno-fœtale du ZIKV par les cellules dNK.

En plus des travaux sur les facteurs solubles, il sera également important de caractériser les conséquences de la reconnaissance des cellules infectées sur le phénotype et la fonction des cellules dNK. Nos expériences préliminaires dans ce domaine suggèrent que le contrôle de la réplication virale dans les DSC n'est pas associé à des modifications majeures du phénotype des cellules dNK. Il faudra cependant reproduire ces expériences en testant un panel de récepteurs plus large. De plus, les travaux de notre équipe sur le HCMV avaient permis de démontrer une grande plasticité fonctionnelle des cellules dNK [652,685]. En réponse à l'infection, les cellules dNK adaptent leur sécrétome en augmentant la sécrétion de molécules effectrices (IL-6, GzmB) au détriment de leur fonction pro-grossesse (sécrétion réduite de CXCL-8 et CXCL-10). Ainsi, même si les cellules dNK permettent un contrôle efficace de l'infection et protègent de la transmission verticale, les conséquences de leur réponse effectrice pourraient potentiellement devenir délétères et participer au

développement de la pathologie placentaire. Cette possibilité reste cependant hypothétique et nécessite une étude approfondie pour pouvoir être confirmée ou infirmée. Enfin, il serait intéressant d'étudier si, comme pour le HCMV, la reconnaissance des cellules infectées par le ZIKV permet la mise en place d'une synapse immunologique et le déclenchement des fonctions effectrices des cellules dNK.

Une autre donnée importante révélée par nos travaux est le fait que l'inhibition de la production virale soit partiellement perdue si les cellules dNK sont plusieurs jours après l'infection. Cela suggère que l'action des cellules dNK se passe de manière précoce lors de l'infection. Au contraire, tout délai dans la mise en place de la réponse effectrice des cellules dNK aurait pour conséquence de permettre à l'infection de s'installer et de devenir suffisamment forte pour échapper au contrôle des cellules dNK. Cela pourrait permettre d'expliquer pourquoi seulement un faible pourcentage des femmes infectées transmet le virus au fœtus. De manière intéressante, des résultats préliminaires de notre équipe montrent une perte similaire du contrôle de la production virale par l'IFN- γ lorsqu'il est rajouté après plusieurs jours d'infection. Cela renforce notre hypothèse concernant le rôle central de cette cytokine lors des infections virales.

En conclusion, dans la grande majorité des cas, les cellules dNK seraient capables de détecter l'infection des cellules déciduales par le ZIKV et de contrôler efficacement l'infection en sécrétant différents facteurs solubles dont l'IFN- γ (**Figure 61**). Ce contrôle pourrait également passer par le recrutement de cellules pNK CD56^{bright} depuis la périphérie qui se différencieraient en cellules dNK sous l'effet du microenvironnement local, renforçant alors le contrôle de l'infection. Cependant, ce rôle protecteur doit s'effectuer de manière précoce et tout retard ou perturbation dans la mise en place de ce contrôle se traduirait par un échappement du ZIKV au système immunitaire et par la transmission virale au fœtus. De plus, le contrôle de l'infection par les cellules dNK pourrait également avoir des conséquences plus tardives sur le développement placentaire. L'ensemble des hypothèses de ce modèle devra être confirmé dans des études futures. De plus, nous pourrions également étendre notre modèle à d'autres virus comme le VHE. En effet, une réponse différente des cellules dNK lors de l'infection par le VHE-1 ou le VHE-3 pourrait également participer à expliquer les différences de pathogenèse de ces virus.

G. Importance du microenvironnement cytokinique dans la régulation de la fonction des cellules NK

Durant la troisième partie de mes travaux de thèse, nous avons étudié les mécanismes sous-jacents à la grande hétérogénéité fonctionnelle des cellules dNK et pNK. En effet, les

cellules NK expriment à leur surface un large répertoire de récepteurs activateurs et inhibiteurs, qui transduisent en permanence des signaux modulant leurs fonctions effectrices. Toutefois, les cellules dNK ont des fonctions bien distinctes de celles des cellules pNK. Ainsi, alors que les cellules pNK sont majoritairement cytotoxiques et sécrètent de grandes quantités de médiateurs pro-inflammatoires, les cellules dNK sont dépourvues d'activité cytolytique. En revanche, elles sécrètent de nombreux facteurs de croissance pro-angiogéniques et des chimiokines, qui sont essentiels au bon déroulement de la grossesse. Les différences fonctionnelles entre les cellules dNK et pNK peuvent s'expliquer par l'engagement de récepteurs aux fonctions différentes. En prenant comme exemple la famille des récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCR), ces différences sont majeures. A l'état basal, les cellules dNK expriment constitutivement le récepteur NKp44 contrairement aux cellules pNK, pour lesquelles ce récepteur est inducible [653]. De plus, ce récepteur est associé à des fonctions inhibitrices dans les cellules dNK alors qu'il est activateur dans les cellules pNK [685]. Concernant NKp30, une étude a montré que ce récepteur code pour trois isoformes du récepteur NKp30a, b et c qui peuvent induire la fonction cytotoxique, la fonction cytokinique ou inhiber l'activation des cellules NK respectivement [281].

La régulation de la fonction des cellules dNK *via* les récepteurs NKp30 et NKp44 est essentielle à leurs fonctions auxiliaires pro-invasives et pro-angiogéniques durant la grossesse [665]. Cette régulation est d'autant plus importante que des ligands de ces récepteurs sont constitutivement exprimés par les cellules stromales déciduales. L'hypothèse de notre équipe était que les transcrits de NKp44 et NKp30 sont différentiellement exprimés par les cellules dNK et les cellules pNK [1011]. Les analyses par qRT-PCR indiquent que les cellules dNK expriment majoritairement les transcrits codant pour NKp30c et NKp44c, qui sont associés aux fonctions régulatrices de ces récepteurs. Au contraire, les cellules pNK expriment majoritairement les isoformes codant pour NKp30a et NKp44b et associés aux fonctions activatrices. L'expression différentielle des isoformes de ces récepteurs entre les cellules dNK et les cellules pNK permet d'expliquer les différences fonctionnelles observées entre les deux types cellulaires. Cela se traduit notamment par une incapacité des cellules dNK à polariser leurs granules lytiques lors de la stimulation *via* NKp30 ou NKp44, tandis que les deux récepteurs le permettent pour les cellules pNK. A l'inverse, aucune différence n'est observée entre cellules dNK et cellules pNK pour le récepteur NKp46. En parallèle, nous avons également confirmé le rôle inhibiteur de NKp44 dans les cellules dNK car le co-engagement de NKp44 et NKp46 dans ces cellules diminue la dégranulation, par rapport aux cellules dNK ou seul NKp46 est engagé.

En utilisant différentes combinaisons cytokiniques, nous avons montré que le microenvironnement décidual, riche en IL-15, IL-18 et TGF- β , contrôle le phénotype des

cellules NK mais également l'expression différentielle de transcrits de NKp30 et NKp44. Ainsi, ces cytokines permettent de modifier le ratio d'expression de ces différentes isoformes dans les cellules pNK vers un profil plus régulateur, caractérisé par l'augmentation de l'expression de NKp30c et NKp44c (**Figure 62**). Il en résulte une diminution de la capacité cytotoxique et une adaptation de la fonction sécrétrice (diminution d'IFN- γ et TNF- α , augmentation de VEGF-A) après engagement spécifique de NKp30 et NKp44. Au contraire, la capacité de NKp46 à induire les fonctions effectrices des cellules pNK est conservée quel que soient les conditions de culture. Les mécanismes qui régulent la transcription préférentielle d'une isoforme en particulier restent toujours inconnus et nécessiteront des études approfondies pour être élucidés.

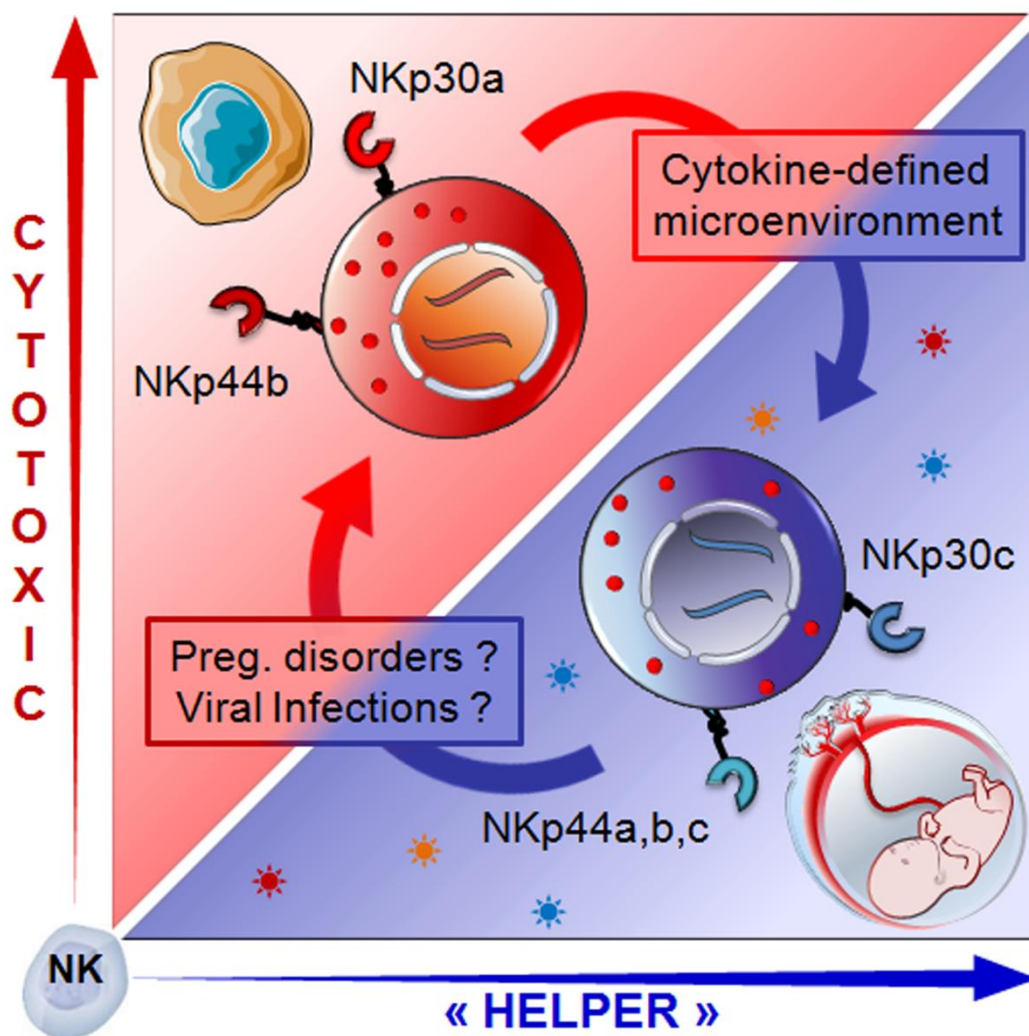


Figure 62 : Régulation des cellules NK par le microenvironnement cytokinique.

En plus du microenvironnement cytokinique, il est possible que d'autres facteurs interviennent dans la régulation des fonctions effectrices des cellules NK. En accord avec cette possibilité, même si nos travaux montrent une conversion des cellules pNK en cellules dNK-like, les cytokines utilisées restent incapables de moduler l'expression du CD16

(caractéristique des cellules dNK). Parmi les facteurs importants qui pourraient expliquer cette observation on trouve notamment l'hypoxie, qui est caractéristique du début de la grossesse. Cette hypoxie est nécessaire au développement du placenta mais également à l'induction de modifications phénotypiques dans les cellules NK cultivées en présence de TGF- β [1041]. Ainsi, combinée au microenvironnement cytokinique décidual, l'hypoxie pourrait permettre de compléter la transformation des cellules pNK en cellules NK ayant des caractéristiques déciduales. Ces résultats, ajoutés aux nôtres suggèrent alors que, quelque soit l'origine des cellules dNK, l'influence du microenvironnement local est suffisante et nécessaire à leur conférer leur phénotype et leurs fonctions uniques.

La régulation par le microenvironnement cytokinique conditionne l'expression préférentielle des transcrits de NKp30 et NKp44 et les fonctions qui y sont associées. En dehors de la grossesse, d'autres situations physiologiques ou pathologiques (infections virales, transformations tumorales) sont également responsables de modifications du microenvironnement qui pourraient, en conséquence, impacter directement les cellules NK. Cela a déjà été étudié dans des cas de cancers pour NKp30 mais jamais dans le contexte de pathologies infectieuses [281]. Plus récemment, il a également été montré que l'expression de l'isoforme inhibitrice de NKp44 est également associée à un mauvais pronostic chez des patients atteints de leucémies [288]. Même si rien n'est connu concernant les infections virales, il est clairement établi qu'elles perturbent l'homéostasie tissulaire et le microenvironnement local. Ainsi, l'infection par le VHC diminue l'expression et la capacité d'activation des cellules NK *via* le récepteur NKp30, suggérant alors une régulation par le microenvironnement local [1042]. De plus, l'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) induit une sécrétion de TGF- β , qui diminue l'expression des récepteurs NKG2D et 2B4 [1043]. Il a cependant été montré que l'IL-15 permet de compenser le défaut causé par le TGF- β et restaure partiellement la fonction des cellules NK [1044]. Ainsi, durant les infections virales, le rôle du microenvironnement cytokinique semble dépendre du pathogène considéré. Ainsi, certains virus vont causer une inflammation massive qui va alors orienter les cellules NK vers un profil effecteur afin de favoriser l'élimination virale. Au contraire, certains mécanismes d'échappement viraux passent par la sécrétion de facteurs solubles anti-inflammatoires, qui seraient alors responsable de l'induction des isoformes immuno-modulatrices et d'un défaut de réponse des cellules NK. Dans le cas du VHB, cette immunosuppression pourrait être associée à la persistance virale et au passage vers la chronicité. Il serait maintenant important de confirmer le rôle du microenvironnement dans la modulation des fonctions des cellules NK durant les infections virales. A ce titre, le VHE représente un modèle intéressant car il est associé à une inflammation dont l'intensité varie en fonction du génotype viral considéré. Ainsi, nous comparerons l'effet de milieux

conditionnés préparés à partir de tissus infectés par le VHE-1 et le VHE-3 dans la modification des isoformes de NKp30 et NKp44, mais aussi dans les fonctions effectrices des cellules pNK et dNK. Notre hypothèse est que le VHE-1 sera responsable d'une dérégulation majeure des fonctions des cellules dNK, qui pourrait alors contribuer à l'exacerbation de la pathogenèse virale. En accord avec cette hypothèse, de nombreuses études ont établi un lien entre la dérégulation du niveau d'IL-15, IL-18 et TGF- β et la survenue de pathologies de la grossesse telles que la pré-éclampsie [1045-1047]. Ainsi, des niveaux de cytokines dérégulés modifieraient le ratio des différents transcrits de NKp30 et NKp44 (activateurs vs inhibiteurs), ce qui pourrait impacter directement les fonctions des cellules dNK et participer à la pathogenèse placentaire. Des productions excessives d'IL-15 favoriseraient alors l'expression de l'isoforme NKp30a, rendant les trophoblastes et les cellules stromales plus susceptibles à l'activité lytique des cellules dNK. De plus, les cellules dNK sécrèteraient moins de chimiokines, ce qui impacterait l'invasion trophoblastique de la *decidua basalis*, empêchant également le remodelage vasculaire utérin. En accord avec cette hypothèse, une étude récente a fait le lien entre le niveau d'expression des isoformes de NKp30 au niveau de l'interface mère-fœtus et la survenue de fausses couches [1048]. Elle a notamment montré que les femmes victimes de fausses couches ont une expression augmentée de l'isoforme activatrice NKp30a associée à un défaut d'expression du PLGF, qui est un des facteurs de croissance sécrété par les cellules dNK et nécessaire au maintien de la grossesse.

Enfin, dans le but d'élargir nos résultats, il serait intéressant d'étendre cette étude à d'autres populations cellulaires et à d'autres microenvironnements. Il a par exemple été montré qu'une population de DC plasmacytoïdes dans les amygdales exprimait NKp44 et que l'engagement de ce récepteur était associé à une diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires [1049]. Il est alors envisageable que le microenvironnement cytokinique local favorise préférentiellement l'expression de l'isoforme inhibitrice NKp44c et soit ainsi responsable des modifications fonctionnelles. Cette possibilité reste cependant à confirmer. En parallèle, il pourrait également être important de tester le rôle des variants d'épissage de NKp44 dans les ILC3, qui expriment ce récepteur chez l'Homme.

H. Rôle des LT CD8 dans la pathogenèse du VHE-3 chez les personnes âgées

Dans la dernière partie de mes travaux de thèse, nous avons cherché à comprendre les mécanismes responsables de la sévérité accrue du VHE-3 chez les personnes âgées. Pour cela, nous avons fait une étude phénotypique et fonctionnelle de la réponse LT CD8 chez

des patients symptomatiques et asymptomatiques (**Figure 63**). Nous avons alors découvert, uniquement chez les patients symptomatiques, des altérations phénotypiques majeures dans le compartiment des LT CD8_{EM}. Ces altérations sont caractérisées par la surexpression des récepteurs inhibiteurs PD-1, TIM-3 et LAG-3, associée à une forte activation défini par l'expression des marqueurs CD38 et HLA-DR. Une forte expression de ces récepteurs inhibiteurs est caractéristique d'un épuisement du système immunitaire, notamment lors d'infections virales chroniques ou de cancers. Cependant ces marqueurs peuvent également retrouvés lors d'infections aiguës, suggérant alors que leur capacité à inhiber la réponse effectrice est dépendante du contexte pathologique et de la durée de la stimulation [1050]. Ainsi, lors des infections aiguës, l'expression de ces récepteurs inhibiteurs serait plutôt associée à une fonction régulatrice visant à tempérer la réponse effectrice et à empêcher toute sur-activation qui pourrait devenir délétère [1051,1052]. Etant donné que l'infection par le VHE n'est pas chronique chez des patients immunocompétents, la forte expression de ces récepteurs inhibiteurs pourrait être une conséquence directe de la sur-activation des LT CD8_{EM}. En parallèle, nous avons également observé une diminution de l'expression de CD127, essentiel à l'homéostasie des LT mémoires, et de CD161 qui permet de définir une sous population cellulaire qui peut être recrutée au niveau du foie [647,648,1053]. De telles caractéristiques phénotypiques sont également retrouvées dans d'autres hépatites virales et sont associées à un mauvais pronostic [1053,1054].

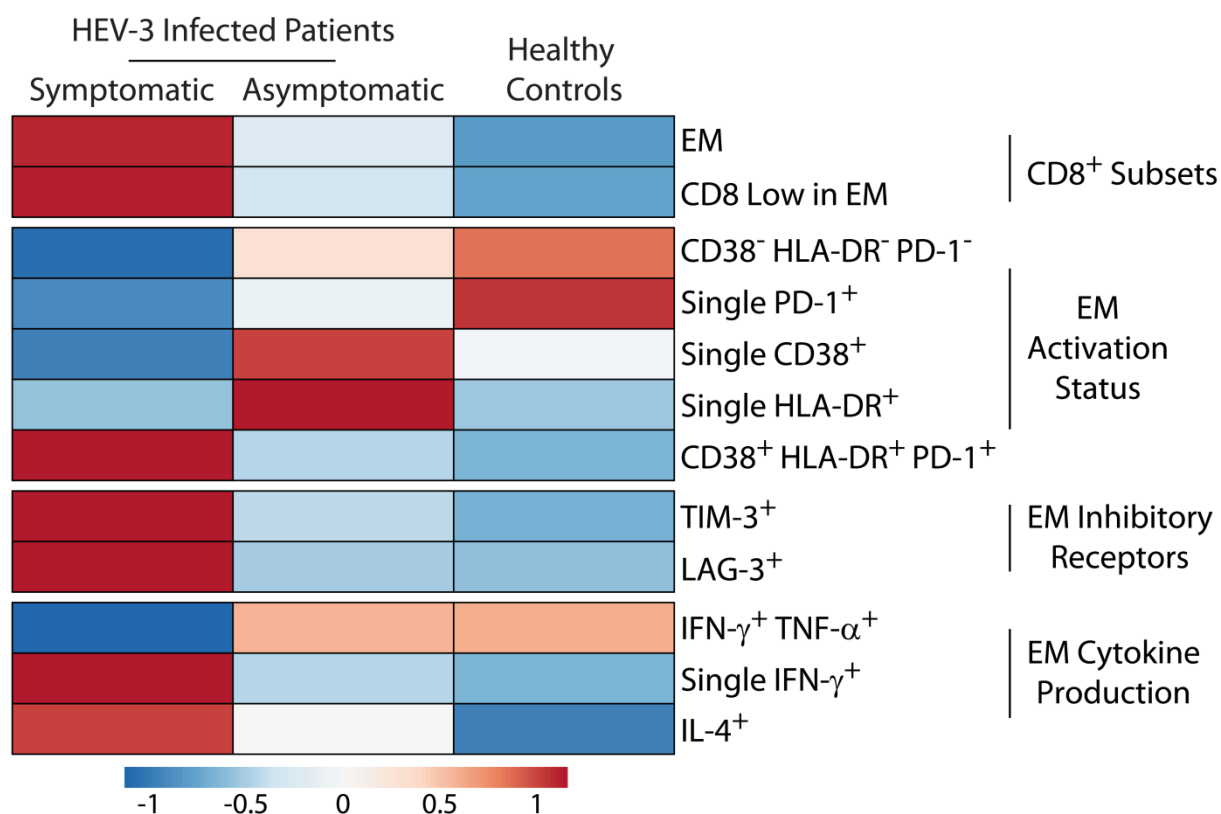


Figure 63 : Altérations des LT CD8_{EM} causées par le VHE-3 chez les personnes âgées.

Chez les patients symptomatiques, l'infection par VHE s'accompagne d'une altération du phénotype des LT CD8_{EM} qui touche la quasi-totalité des cellules. Sachant que les LT CD8 spécifiques du VHE représentent moins de 2% des cellules totales, il semblerait que l'activation massive observée chez les patients symptomatiques résulte d'un effet bystander [895]. En accord avec cette hypothèse, une telle dérégulation phénotypique a déjà été associée à la pathogenèse de virus tels que le VHA ou le VHB [171,1055]. Ainsi, la forte activation du compartiment LT CD8_{EM} chez les patients symptomatiques pourrait correspondre à une réactivation de populations mémoires spécifiques du HCMV ou de l'EBV, sous l'effet du microenvironnement pro-inflammatoire. Les peptides immuno-dominants du VHE n'étant pas connus, il n'est pas possible d'utiliser des tétramères pour cibler spécifiquement les cellules spécifiques du VHE. Cependant, nous pourrions confirmer l'effet bystander en montrant la spécificité des LT CD8 hyper-activés pour le HCMV ou l'EBV. Enfin, l'analyse des sous-types du VHE-3 ou de la charge virale chez les différents groupes de patients n'a montré aucune différence. Ainsi, le fort état d'activation des LT CD8_{EM} et tout particulièrement la triple expression de HLA-DR/CD38/PD-1 reste le seul marqueur permettant de distinguer les patients symptomatiques et asymptomatiques. A ce titre, il pourrait être intéressant de tester si une telle signature phénotypique est retrouvée dans d'autres groupes à haut risque de complications par le VHE-3, tels que les patients immunodéprimés. On pourrait alors imaginer que les patients présentant cette signature phénotypique seraient plus susceptibles d'évoluer vers la chronicité plutôt que vers une résolution spontanée.

De manière surprenante, nous avons observé que cette sur-activation des LT CD8_{EM} chez les patients symptomatiques était associée à une diminution de la production de TNF- α , et dans une moindre mesure d'IL-2. De plus, nous avons montré que la perte de ces cytokines était directement associée au degré d'activation des cellules, car les LT CD8_{EM} HLA-DR⁻/CD38⁻/PD-1⁻ des patients symptomatiques ne présentent aucun défaut fonctionnel. Au contraire, les LT CD8_{EM} HLA-DR⁺/CD38⁺/PD-1⁺ ont un défaut fonctionnel majeur caractérisé par une perte de polyfonctionnalité de ces cellules qui restent seulement capables de produire de l'IFN- γ (**Figure 63**). Les conséquences de ce défaut sont d'autant plus importantes que la population de LT CD8_{EM} hyper-activée devient majoritaire chez les patients symptomatiques. Une telle perte de polyfonctionnalité est également observée dans les premières phases de l'épuisement des LT [1056]. Cela révèle des similarités entre le VHE-3 et d'autres infections chroniques en termes de conséquences fonctionnelles. Dans le contexte des patients immunodéprimés, cet épuisement partiel des LT CD8 pourrait contribuer à l'évolution vers les formes chroniques de l'infection.

En plus des défauts phénotypiques et fonctionnels des LT CD8_{EM} chez les patients symptomatiques, nous avons également découvert l'émergence d'une population de cellules LT CD8^{low} productrice d'IL-4 (phénotype Tc2). A l'inverse des cytokines de type Th1, la production d'IL-4 est augmentée dans les cellules hyper-activées et est inversement corrélée à la production de TNF- α , suggérant qu'elle pourrait agir comme un régulateur négatif de l'activation des LT CD8. En accord avec cette possibilité, il a été montré que l'IL-4 pouvait inhiber la fonction cytotoxique et diminuer la production de cytokines Th1 par les LT CD8 de manière paracrine [1057,1058]. De plus, différents paramètres tels que le vieillissement, la présentation antigénique persistante et le microenvironnement cytokinique favorisent la différenciation des LT CD8 en cellules Tc2 CD8^{low} [1059-1061]. Il sera maintenant important de déterminer l'importance relative de chacun de ces mécanismes dans notre étude. Les formes symptomatiques étant uniquement retrouvées chez les personnes âgées, l'âge joue clairement un rôle dans l'émergence de la population de cellules Tc2 productrices d'IL-4. Il ne permet cependant pas d'expliquer les différences entre les groupes de patients, dont l'âge n'est significativement pas différent, et suggère un rôle d'autres facteurs. Enfin, il faudra déterminer si l'émergence de cette population est une cause ou une conséquence de la pathogenèse virale exacerbée chez les patients symptomatiques.

Il est classiquement admis que l'intensité et la qualité des réponses effectrices des LT sont essentielles à l'élimination ou à la persistance virale [1062]. Dans le contexte de notre étude ces deux paramètres sont perturbés, mais uniquement chez les patients symptomatiques. Il en résulte un biais fonctionnel majeur caractérisé par un défaut de production de TNF- α et une accumulation de cellules Tc2, qui pourraient être responsables de l'aggravation de la pathologie. En accord avec cette possibilité, il a été montré une exacerbation de la sévérité du VHE chez un patients sous traitement anti-TNF- α [1063]. La perte de polyfonctionnalité au profit de l'émergence de cellules monofonctionnelles est également associée à des défauts d'élimination virale [1064,1065]. Cependant, dans notre étude, la charge virale est identique entre les différents groupes et l'infection est éliminée chez tous les patients. Cela suggère que dans tous les cas, la réponse immune est suffisante au contrôle de l'infection. En revanche, chez les patients symptomatiques, l'épuisement partiel des LT CD8 et l'émergence des cellules Tc2 suggèrent que la réponse doit être plus forte pour permettre un contrôle efficace de l'infection ; ce qui pourrait expliquer le phénotype hyper-activé, la réponse bystander mais aussi la survenue des symptômes. Il sera important de vérifier cette hypothèse en analysant le niveau de différents médiateurs de l'inflammation (IFN- γ , TNF- α , IL-4, ...) dans le sérum des différents groupes de patients.

Références

Bibliographiques

1. Moffett A, Loke C (2006) Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nat Rev Immunol* 6: 584-594.
2. Horne AW, Stock SJ, King AE (2008) Innate immunity and disorders of the female reproductive tract. *Reproduction* 135: 739-749.
3. McGee EA, Hsueh AJ (2000) Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 21: 200-214.
4. Stocco C, Telleria C, Gibori G (2007) The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocr Rev* 28: 117-149.
5. Maybin JA, Critchley HO (2015) Menstrual physiology: implications for endometrial pathology and beyond. *Hum Reprod Update* 21: 748-761.
6. da Costa e Silva Rde C, Moura KK, Ribeiro Junior CL, Guillo LA (2016) Estrogen signaling in the proliferative endometrium: implications in endometriosis. *Rev Assoc Med Bras* (1992) 62: 72-77.
7. Gielen SC, Santegoets LA, Kuhne LC, Van Ijcken WF, Boers-Sijmons B, et al. (2007) Genomic and nongenomic effects of estrogen signaling in human endometrial cells: involvement of the growth factor receptor signaling downstream AKT pathway. *Reprod Sci* 14: 646-654.
8. Kleinstein J, Westermann W, Mennenga K, Gustmann C, Gips H (1993) Estrogen induces expression of endometrial epidermal growth factor receptors before implantation. *Am J Reprod Immunol* 30: 58-62.
9. Eckert RL, Katzenellenbogen BS (1981) Human endometrial cells in primary tissue culture: modulation of the progesterone receptor level by natural and synthetic estrogens in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 52: 699-708.
10. Kurita T, Young P, Brody JR, Lydon JP, O'Malley BW, et al. (1998) Stromal progesterone receptors mediate the inhibitory effects of progesterone on estrogen-induced uterine epithelial cell deoxyribonucleic acid synthesis. *Endocrinology* 139: 4708-4713.
11. Park DW, Yang KM (2011) Hormonal regulation of uterine chemokines and immune cells. *Clin Exp Reprod Med* 38: 179-185.
12. Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR (1999) Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *N Engl J Med* 340: 1796-1799.
13. Cole LA (2010) Biological functions of hCG and hCG-related molecules. *Reprod Biol Endocrinol* 8: 102.
14. Fitzgerald JS, Poehlmann TG, Schleussner E, Markert UR (2008) Trophoblast invasion: the role of intracellular cytokine signalling via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). *Hum Reprod Update* 14: 335-344.
15. Achache H, Revel A (2006) Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update* 12: 731-746.
16. Aplin JD, Ruane PT (2017) Embryo-epithelium interactions during implantation at a glance. *J Cell Sci* 130: 15-22.
17. Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazleabas AT, et al. (2000) Embryo implantation. *Dev Biol* 223: 217-237.
18. Salleh N, Giribabu N (2014) Leukemia inhibitory factor: roles in embryo implantation and in nonhormonal contraception. *ScientificWorldJournal* 2014: 201514.
19. Aplin JD, Kimber SJ (2004) Trophoblast-uterine interactions at implantation. *Reprod Biol Endocrinol* 2: 48.
20. Kimber SJ, Spanswick C (2000) Blastocyst implantation: the adhesion cascade. *Semin Cell Dev Biol* 11: 77-92.
21. Preston AM, Lindsay LA, Murphy CR (2006) Desmosomes in uterine epithelial cells decrease at the time of implantation: an ultrastructural and morphometric study. *J Morphol* 267: 103-108.

22. Zhu JY, Pang ZJ, Yu YH (2012) Regulation of trophoblast invasion: the role of matrix metalloproteinases. *Rev Obstet Gynecol* 5: e137-143.
23. Staun-Ram E, Goldman S, Gabarin D, Shalev E (2004) Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reprod Biol Endocrinol* 2: 59.
24. Ball E, Bulmer JN, Ayis S, Lyall F, Robson SC (2006) Late sporadic miscarriage is associated with abnormalities in spiral artery transformation and trophoblast invasion. *J Pathol* 208: 535-542.
25. Kadyrov M, Kingdom JC, Huppertz B (2006) Divergent trophoblast invasion and apoptosis in placental bed spiral arteries from pregnancies complicated by maternal anemia and early-onset preeclampsia/intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 194: 557-563.
26. Demir R, Kaufmann P, Castellucci M, Erben T, Kotowski A (1989) Fetal vasculogenesis and angiogenesis in human placental villi. *Acta Anat (Basel)* 136: 190-203.
27. Huppertz B, Frank HG, Reister F, Kingdom J, Korh H, et al. (1999) Apoptosis cascade progresses during turnover of human trophoblast: analysis of villous cytotrophoblast and syncytial fragments in vitro. *Lab Invest* 79: 1687-1702.
28. al-Lamki RS, Skepper JN, Burton GJ (1999) Are human placental bed giant cells merely aggregates of small mononuclear trophoblast cells? An ultrastructural and immunocytochemical study. *Hum Reprod* 14: 496-504.
29. Velicky P, Knofler M, Pollheimer J (2016) Function and control of human invasive trophoblast subtypes: Intrinsic vs. maternal control. *Cell Adh Migr* 10: 154-162.
30. Weiss G, Sundl M, Glasner A, Huppertz B, Moser G (2016) The trophoblast plug during early pregnancy: a deeper insight. *Histochem Cell Biol* 146: 749-756.
31. Pijnenborg R, Vercruysse L, Hanssens M (2006) The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta* 27: 939-958.
32. Pereira RD, De Long NE, Wang RC, Yazdi FT, Holloway AC, et al. (2015) Angiogenesis in the placenta: the role of reactive oxygen species signaling. *Biomed Res Int* 2015: 814543.
33. Wang K, Jiang YZ, Chen DB, Zheng J (2009) Hypoxia enhances FGF2- and VEGF-stimulated human placental artery endothelial cell proliferation: roles of MEK1/2/ERK1/2 and PI3K/AKT1 pathways. *Placenta* 30: 1045-1051.
34. Lunghi L, Ferretti ME, Medici S, Biondi C, Vesce F (2007) Control of human trophoblast function. *Reprod Biol Endocrinol* 5: 6.
35. Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ (1997) Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science* 277: 1669-1672.
36. Hu R, Jin H, Zhou S, Yang P, Li X (2007) Proteomic analysis of hypoxia-induced responses in the syncytialization of human placental cell line BeWo. *Placenta* 28: 399-407.
37. Whitley GS, Cartwright JE (2010) Cellular and molecular regulation of spiral artery remodelling: lessons from the cardiovascular field. *Placenta* 31: 465-474.
38. Hiden U, Eyth CP, Majali-Martinez A, Desoye G, Tam-Amersdorfer C, et al. (2018) Expression of matrix metalloproteinase 12 is highly specific for non-proliferating invasive trophoblasts in the first trimester and temporally regulated by oxygen-dependent mechanisms including HIF-1A. *Histochem Cell Biol* 149: 31-42.
39. Le Bouteiller P, Blaschitz A (1999) The functionality of HLA-G is emerging. *Immunol Rev* 167: 233-244.
40. Shechter R, London A, Schwartz M (2013) Orchestrated leukocyte recruitment to immune-privileged sites: absolute barriers versus educational gates. *Nat Rev Immunol* 13: 206-218.

41. Bilalis DA, Klentzeris LD, Fleming S (1996) Immunohistochemical localization of extracellular matrix proteins in luteal phase endometrium of fertile and infertile patients. *Hum Reprod* 11: 2713-2718.
42. Can A, Tekelioglu M, Baltaci A (1995) Expression of desmin and vimentin intermediate filaments in human decidual cells during first trimester pregnancy. *Placenta* 16: 261-275.
43. Oliver C, Montes MJ, Galindo JA, Ruiz C, Olivares EG (1999) Human decidual stromal cells express alpha-smooth muscle actin and show ultrastructural similarities with myofibroblasts. *Hum Reprod* 14: 1599-1605.
44. Bronchud MH, Tresserra F, Zantop BS (2018) Epigenetic changes found in uterine decidual and placental tissues can also be found in the breast cancer microenvironment of the same unique patient: description and potential interpretations. *Oncotarget* 9: 6028-6041.
45. Holtan SG, Creedon DJ, Haluska P, Markovic SN (2009) Cancer and pregnancy: parallels in growth, invasion, and immune modulation and implications for cancer therapeutic agents. *Mayo Clin Proc* 84: 985-1000.
46. Canel M, Serrels A, Frame MC, Brunton VG (2013) E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. *J Cell Sci* 126: 393-401.
47. Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK (2011) Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J* 278: 16-27.
48. von Rango U, Krusche CA, Kertschanska S, Alfer J, Kaufmann P, et al. (2003) Apoptosis of extravillous trophoblast cells limits the trophoblast invasion in uterine but not in tubal pregnancy during first trimester. *Placenta* 24: 929-940.
49. Floridon C, Nielsen O, Holund B, Sweep F, Sunde L, et al. (2000) Does plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) control trophoblast invasion? A study of fetal and maternal tissue in intrauterine, tubal and molar pregnancies. *Placenta* 21: 754-762.
50. Riley SC, Leask R, Denison FC, Wisely K, Calder AA, et al. (1999) Secretion of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases by human fetal membranes, decidua and placenta at parturition. *J Endocrinol* 162: 351-359.
51. Spinillo A, Gardella B, Bariselli S, Alfei A, Silini E, et al. (2012) Placental histopathological correlates of umbilical artery Doppler velocimetry in pregnancies complicated by fetal growth restriction. *Prenat Diagn* 32: 1263-1272.
52. Stark MW, Clark L, Craver RD (2014) Histologic differences in placentas of preeclamptic/eclamptic gestations by birthweight, placental weight, and time of onset. *Pediatr Dev Pathol* 17: 181-189.
53. Hannon T, Innes BA, Lash GE, Bulmer JN, Robson SC (2012) Effects of local decidua on trophoblast invasion and spiral artery remodeling in focal placenta creta - an immunohistochemical study. *Placenta* 33: 998-1004.
54. Burton GJ, Watson AL, Hempstock J, Skepper JN, Jauniaux E (2002) Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2954-2959.
55. Hempstock J, Cindrova-Davies T, Jauniaux E, Burton GJ (2004) Endometrial glands as a source of nutrients, growth factors and cytokines during the first trimester of human pregnancy: a morphological and immunohistochemical study. *Reprod Biol Endocrinol* 2: 58.
56. Hustin J, Schaaps JP (1987) Echographic [corrected] and anatomic studies of the maternotrophoblastic border during the first trimester of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 157: 162-168.
57. Gray CA, Burghardt RC, Johnson GA, Bazer FW, Spencer TE (2002) Evidence that absence of endometrial gland secretions in uterine gland knockout ewes compromises conceptus survival and elongation. *Reproduction* 124: 289-300.

58. Burton GJ, Jauniaux E, Charnock-Jones DS (2007) Human early placental development: potential roles of the endometrial glands. *Placenta* 28 Suppl A: S64-69.
59. Irwin JC, Kirk D, King RJ, Quigley MM, Gwatkin RB (1989) Hormonal regulation of human endometrial stromal cells in culture: an in vitro model for decidualization. *Fertil Steril* 52: 761-768.
60. Maeyama M, Sudo I, Saito K, Matsuo I, Nakahara K (1977) Glycogen estimation by a rapid enzymic method in very small samples of human endometrium: glycogen content in the endometrium of infertile patients during the menstrual cycle. *Fertil Steril* 28: 159-162.
61. Demir R, Kayisli UA, Celik-Ozenci C, Korgun ET, Demir-Weusten AY, et al. (2002) Structural differentiation of human uterine luminal and glandular epithelium during early pregnancy: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Placenta* 23: 672-684.
62. Paulesu L, Bhattacharjee J, Bechi N, Romagnoli R, Jantra S, et al. (2010) Pro-inflammatory cytokines in animal and human gestation. *Curr Pharm Des* 16: 3601-3615.
63. Jabbour HN, Critchley HO (2001) Potential roles of decidual prolactin in early pregnancy. *Reproduction* 121: 197-205.
64. Wu WX, Brooks J, Glasier AF, McNeilly AS (1995) The relationship between decidualization and prolactin mRNA and production at different stages of human pregnancy. *J Mol Endocrinol* 14: 255-261.
65. Lkhider M, Seddiki T, Ollivier-Bousquet M (2010) [Prolactin and its cleaved 16 kDa fragment]. *Med Sci (Paris)* 26: 1049-1055.
66. Gorvin CM (2015) The prolactin receptor: Diverse and emerging roles in pathophysiology. *J Clin Transl Endocrinol* 2: 85-91.
67. Jabbour HN, Critchley HO, Boddy SC (1998) Expression of functional prolactin receptors in nonpregnant human endometrium: janus kinase-2, signal transducer and activator of transcription-1 (STAT1), and STAT5 proteins are phosphorylated after stimulation with prolactin. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 2545-2553.
68. Ormandy CJ, Camus A, Barra J, Damotte D, Lucas B, et al. (1997) Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes Dev* 11: 167-178.
69. Garzia E, Borgato S, Cozzi V, Doi P, Bulfamante G, et al. (2004) Lack of expression of endometrial prolactin in early implantation failure: a pilot study. *Hum Reprod* 19: 1911-1916.
70. Stefanoska I, Jovanovic Krivokuca M, Vasilijic S, Cujic D, Vicovac L (2013) Prolactin stimulates cell migration and invasion by human trophoblast in vitro. *Placenta* 34: 775-783.
71. Clapp C, Weiner RI (1992) A specific, high affinity, saturable binding site for the 16-kilodalton fragment of prolactin on capillary endothelial cells. *Endocrinology* 130: 1380-1386.
72. Struman I, Bentzien F, Lee H, Mainfroid V, D'Angelo G, et al. (1999) Opposing actions of intact and N-terminal fragments of the human prolactin/growth hormone family members on angiogenesis: an efficient mechanism for the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 1246-1251.
73. Goldsmith LT, Weiss G (2009) Relaxin in human pregnancy. *Ann N Y Acad Sci* 1160: 130-135.
74. Telgmann R, Gellersen B (1998) Marker genes of decidualization: activation of the decidual prolactin gene. *Hum Reprod Update* 4: 472-479.

75. Goldsmith LT, Weiss G, Palejwala S, Plant TM, Wojtczuk A, et al. (2004) Relaxin regulation of endometrial structure and function in the rhesus monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4685-4689.
76. Palejwala S, Stein DE, Weiss G, Monia BP, Tortoriello D, et al. (2001) Relaxin positively regulates matrix metalloproteinase expression in human lower uterine segment fibroblasts using a tyrosine kinase signaling pathway. *Endocrinology* 142: 3405-3413.
77. Qin X, Chua PK, Ohira RH, Bryant-Greenwood GD (1997) An autocrine/paracrine role of human decidua relaxin. II. Stromelysin-1 (MMP-3) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1). *Biol Reprod* 56: 812-820.
78. Qin X, Garibay-Tupas J, Chua PK, Cachola L, Bryant-Greenwood GD (1997) An autocrine/paracrine role of human decidua relaxin. I. Interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) and tissue plasminogen activator. *Biol Reprod* 56: 800-811.
79. Masuhiro K, Matsuzaki N, Nishino E, Taniguchi T, Kameda T, et al. (1991) Trophoblast-derived interleukin-1 (IL-1) stimulates the release of human chorionic gonadotropin by activating IL-6 and IL-6-receptor system in first trimester human trophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 72: 594-601.
80. Minas V, Loutradis D, Makrigiannakis A (2005) Factors controlling blastocyst implantation. *Reprod Biomed Online* 10: 205-216.
81. Meisser A, Chardonnens D, Campana A, Bischof P (1999) Effects of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 alpha, macrophage colony stimulating factor and transforming growth factor beta on trophoblastic matrix metalloproteinases. *Mol Hum Reprod* 5: 252-260.
82. Meisser A, Cameo P, Islami D, Campana A, Bischof P (1999) Effects of interleukin-6 (IL-6) on cytotrophoblastic cells. *Mol Hum Reprod* 5: 1055-1058.
83. Cork BA, Tuckerman EM, Li TC, Laird SM (2002) Expression of interleukin (IL)-11 receptor by the human endometrium in vivo and effects of IL-11, IL-6 and LIF on the production of MMP and cytokines by human endometrial cells in vitro. *Mol Hum Reprod* 8: 841-848.
84. Dimitriadis E, Robb L, Salamonsen LA (2002) Interleukin 11 advances progesterone-induced decidualization of human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 8: 636-643.
85. Kitaya K, Yasuda J, Yagi I, Tada Y, Fushiki S, et al. (2000) IL-15 expression at human endometrium and decidua. *Biol Reprod* 63: 683-687.
86. Zygmunt M, Hahn D, Kiesenbauer N, Munstedt K, Lang U (1998) Invasion of cytotrophoblastic (JEG-3) cells is up-regulated by interleukin-15 in vitro. *Am J Reprod Immunol* 40: 326-331.
87. Carson WE, Giri JG, Lindemann MJ, Linett ML, Ahdieh M, et al. (1994) Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J Exp Med* 180: 1395-1403.
88. Laskarin G, Strbo N, Bogovic Crncic T, Juretic K, Ledee Bataille N, et al. (2005) Physiological role of IL-15 and IL-18 at the maternal-fetal interface. *Chem Immunol Allergy* 89: 10-25.
89. Novick D, Kim S, Kaplanski G, Dinarello CA (2013) Interleukin-18, more than a Th1 cytokine. *Semin Immunol* 25: 439-448.
90. Tokmadzic VS, Tsuji Y, Bogovic T, Laskarin G, Cupurdija K, et al. (2002) IL-18 is present at the maternal-fetal interface and enhances cytotoxic activity of decidual lymphocytes. *Am J Reprod Immunol* 48: 191-200.
91. Bauer S, Pollheimer J, Hartmann J, Husslein P, Aplin JD, et al. (2004) Tumor necrosis factor-alpha inhibits trophoblast migration through elevation of plasminogen activator inhibitor-1 in first-trimester villous explant cultures. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 812-822.

92. Huber AV, Saleh L, Bauer S, Husslein P, Knofler M (2006) TNF α -mediated induction of PAI-1 restricts invasion of HTR-8/SVneo trophoblast cells. *Placenta* 27: 127-136.
93. Graham CH, Lysiak JJ, McCrae KR, Lala PK (1992) Localization of transforming growth factor-beta at the human fetal-maternal interface: role in trophoblast growth and differentiation. *Biol Reprod* 46: 561-572.
94. Zenclussen AC, Gerlof K, Zenclussen ML, Ritschel S, Zambon Bertoja A, et al. (2006) Regulatory T cells induce a privileged tolerant microenvironment at the fetal-maternal interface. *Eur J Immunol* 36: 82-94.
95. Graham CH, Connelly I, MacDougall JR, Kerbel RS, Stetler-Stevenson WG, et al. (1994) Resistance of malignant trophoblast cells to both the anti-proliferative and anti-invasive effects of transforming growth factor-beta. *Exp Cell Res* 214: 93-99.
96. Lash GE, Otun HA, Innes BA, Bulmer JN, Searle RF, et al. (2005) Inhibition of trophoblast cell invasion by TGF β 1, 2, and 3 is associated with a decrease in active proteases. *Biol Reprod* 73: 374-381.
97. Djurovic S, Schjetlein R, Wisloff F, Haugen G, Husby H, et al. (1997) Plasma concentrations of Lp(a) lipoprotein and TGF- β 1 are altered in preeclampsia. *Clin Genet* 52: 371-376.
98. Mori M, Ishikawa G, Luo SS, Mishima T, Goto T, et al. (2007) The cytotrophoblast layer of human chorionic villi becomes thinner but maintains its structural integrity during gestation. *Biol Reprod* 76: 164-172.
99. Lager S, Powell TL (2012) Regulation of nutrient transport across the placenta. *J Pregnancy* 2012: 179827.
100. Ericsson A, Hamark B, Powell TL, Jansson T (2005) Glucose transporter isoform 4 is expressed in the syncytiotrophoblast of first trimester human placenta. *Hum Reprod* 20: 521-530.
101. Campbell FM, Bush PG, Veerkamp JH, Dutta-Roy AK (1998) Detection and cellular localization of plasma membrane-associated and cytoplasmic fatty acid-binding proteins in human placenta. *Placenta* 19: 409-415.
102. Kazantzis M, Stahl A (2012) Fatty acid transport proteins, implications in physiology and disease. *Biochim Biophys Acta* 1821: 852-857.
103. Desforges M, Mynett KJ, Jones RL, Greenwood SL, Westwood M, et al. (2009) The SNAT4 isoform of the system A amino acid transporter is functional in human placental microvillous plasma membrane. *J Physiol* 587: 61-72.
104. Kudo Y, Boyd CA (2001) Characterisation of L-tryptophan transporters in human placenta: a comparison of brush border and basal membrane vesicles. *J Physiol* 531: 405-416.
105. Kane SV, Acquah LA (2009) Placental transport of immunoglobulins: a clinical review for gastroenterologists who prescribe therapeutic monoclonal antibodies to women during conception and pregnancy. *Am J Gastroenterol* 104: 228-233.
106. Morris Buus R, Boockfor FR (2004) Transferrin expression by placental trophoblastic cells. *Placenta* 25: 45-52.
107. Dussurget O, Bierne H, Cossart P (2014) The bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* and the interferon family: type I, type II and type III interferons. *Front Cell Infect Microbiol* 4: 50.
108. Ivashkiv LB, Donlin LT (2014) Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol* 14: 36-49.
109. Racicot K, Aldo P, El-Guindy A, Kwon JY, Romero R, et al. (2017) Cutting Edge: Fetal/Placental Type I IFN Can Affect Maternal Survival and Fetal Viral Load during Viral Infection. *J Immunol* 198: 3029-3032.
110. Racicot K, Kwon JY, Aldo P, Abrahams V, El-Guindy A, et al. (2016) Type I Interferon Regulates the Placental Inflammatory Response to Bacteria and is Targeted by Virus:

- Mechanism of Polymicrobial Infection-Induced Preterm Birth. *Am J Reprod Immunol* 75: 451-460.
111. Fung KY, Mangan NE, Cumming H, Horvat JC, Mayall JR, et al. (2013) Interferon-epsilon protects the female reproductive tract from viral and bacterial infection. *Science* 339: 1088-1092.
 112. Yockey LJ, Jurado KA, Arora N, Millet A, Rakib T, et al. (2018) Type I interferons instigate fetal demise after Zika virus infection. *Sci Immunol* 3.
 113. Bayer A, Lennemann NJ, Ouyang Y, Bramley JC, Morosky S, et al. (2016) Type III Interferons Produced by Human Placental Trophoblasts Confer Protection against Zika Virus Infection. *Cell Host Microbe* 19: 705-712.
 114. Ouyang Y, Mouillet JF, Coyne CB, Sadovsky Y (2014) Review: placenta-specific microRNAs in exosomes - good things come in nano-packages. *Placenta* 35 Suppl: S69-73.
 115. Fabian MR, Sonenberg N (2012) The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nat Struct Mol Biol* 19: 586-593.
 116. Berezikov E, van Tetering G, Verheul M, van de Belt J, van Laake L, et al. (2006) Many novel mammalian microRNA candidates identified by extensive cloning and RAKE analysis. *Genome Res* 16: 1289-1298.
 117. Donker RB, Mouillet JF, Chu T, Hubel CA, Stolz DB, et al. (2012) The expression profile of C19MC microRNAs in primary human trophoblast cells and exosomes. *Mol Hum Reprod* 18: 417-424.
 118. Luo SS, Ishibashi O, Ishikawa G, Ishikawa T, Katayama A, et al. (2009) Human villous trophoblasts express and secrete placenta-specific microRNAs into maternal circulation via exosomes. *Biol Reprod* 81: 717-729.
 119. Delorme-Axford E, Donker RB, Mouillet JF, Chu T, Bayer A, et al. (2013) Human placental trophoblasts confer viral resistance to recipient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 12048-12053.
 120. He C, Klionsky DJ (2009) Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 43: 67-93.
 121. Kroemer G, Marino G, Levine B (2010) Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* 40: 280-293.
 122. Sumpter R, Jr., Levine B (2011) Selective autophagy and viruses. *Autophagy* 7: 260-265.
 123. Orvedahl A, Sumpter R, Jr., Xiao G, Ng A, Zou Z, et al. (2011) Image-based genome-wide siRNA screen identifies selective autophagy factors. *Nature* 480: 113-117.
 124. Talloczy Z, Virgin HWt, Levine B (2006) PKR-dependent autophagic degradation of herpes simplex virus type 1. *Autophagy* 2: 24-29.
 125. Moy RH, Gold B, Molleston JM, Schad V, Yanger K, et al. (2014) Antiviral autophagy restricts Rift Valley fever virus infection and is conserved from flies to mammals. *Immunity* 40: 51-65.
 126. Orvedahl A, MacPherson S, Sumpter R, Jr., Talloczy Z, Zou Z, et al. (2010) Autophagy protects against Sindbis virus infection of the central nervous system. *Cell Host Microbe* 7: 115-127.
 127. Deretic V, Saitoh T, Akira S (2013) Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 13: 722-737.
 128. Law AH, Lee DC, Yuen KY, Peiris M, Lau AS (2010) Cellular response to influenza virus infection: a potential role for autophagy in CXCL10 and interferon-alpha induction. *Cell Mol Immunol* 7: 263-270.

129. Casarini L, Lispi M, Longobardi S, Milosa F, La Marca A, et al. (2012) LH and hCG action on the same receptor results in quantitatively and qualitatively different intracellular signalling. *PLoS One* 7: e46682.
130. Tsampalas M, Gridelet V, Berndt S, Foidart JM, Geenen V, et al. (2010) Human chorionic gonadotropin: a hormone with immunological and angiogenic properties. *J Reprod Immunol* 85: 93-98.
131. Yang M, Lei ZM, Rao Ch V (2003) The central role of human chorionic gonadotropin in the formation of human placental syncytium. *Endocrinology* 144: 1108-1120.
132. Tapia-Pizarro A, Argandona F, Palomino WA, Devoto L (2013) Human chorionic gonadotropin (hCG) modulation of TIMP1 secretion by human endometrial stromal cells facilitates extravillous trophoblast invasion in vitro. *Hum Reprod* 28: 2215-2227.
133. Lee CL, Chiu PC, Hautala L, Salo T, Yeung WS, et al. (2013) Human chorionic gonadotropin and its free beta-subunit stimulate trophoblast invasion independent of LH/hCG receptor. *Mol Cell Endocrinol* 375: 43-52.
134. Wan H, Versnel MA, Leijten LM, van Helden-Meeuwsen CG, Fekkes D, et al. (2008) Chorionic gonadotropin induces dendritic cells to express a tolerogenic phenotype. *J Leukoc Biol* 83: 894-901.
135. Berndt S, Perrier d'Hauterive S, Blacher S, Pequeux C, Lorquet S, et al. (2006) Angiogenic activity of human chorionic gonadotropin through LH receptor activation on endothelial and epithelial cells of the endometrium. *FASEB J* 20: 2630-2632.
136. Toth P, Li X, Rao CV, Lincoln SR, Sanfilippo JS, et al. (1994) Expression of functional human chorionic gonadotropin/human luteinizing hormone receptor gene in human uterine arteries. *J Clin Endocrinol Metab* 79: 307-315.
137. Bagga R, Vasishta K, Majumdar S, Garg SK (1990) Correlation between human placental lactogen levels and glucose metabolism in pregnant women with intrauterine growth retardation. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 30: 310-313.
138. Collins JW, Jr., Finley SL, Merrick D, Ogata ES (1988) Human placental lactogen administration in the pregnant rat: acceleration of fetal growth. *Pediatr Res* 24: 663-667.
139. Karabulut AK, Layfield R, Pratten MK (2001) Growth promoting effects of human placental lactogen during early organogenesis: a link to insulin-like growth factors. *J Anat* 198: 651-662.
140. Gaide Chevonnay HP, Selvais C, Emonard H, Galant C, Marbaix E, et al. (2012) Regulation of matrix metalloproteinases activity studied in human endometrium as a paradigm of cyclic tissue breakdown and regeneration. *Biochim Biophys Acta* 1824: 146-156.
141. Halasz M, Szekeres-Bartho J (2013) The role of progesterone in implantation and trophoblast invasion. *J Reprod Immunol* 97: 43-50.
142. Anderson L, Martin W, Higgins C, Nelson SM, Norman JE (2009) The effect of progesterone on myometrial contractility, potassium channels, and tocolytic efficacy. *Reprod Sci* 16: 1052-1061.
143. Wagatsuma T, Sullivan WJ, Jr., Kumar D (1967) The mechanism of action of progesterone on human myometrium. III. In vitro progesterone effects on potassium flux in human myometrium. *Am J Obstet Gynecol* 98: 1050-1056.
144. Lissauer D, Eldershaw SA, Inman CF, Coomarasamy A, Moss PA, et al. (2015) Progesterone promotes maternal-fetal tolerance by reducing human maternal T-cell polyfunctionality and inducing a specific cytokine profile. *Eur J Immunol* 45: 2858-2872.
145. Blankenship TN, Enders AC (2003) Modification of uterine vasculature during pregnancy in macaques. *Microsc Res Tech* 60: 390-401.

146. Georgiades P, Ferguson-Smith AC, Burton GJ (2002) Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta* 23: 3-19.
147. Ashkar AA, Di Santo JP, Croy BA (2000) Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. *J Exp Med* 192: 259-270.
148. Croy BA, Chantakru S, Esadeg S, Ashkar AA, Wei Q (2002) Decidual natural killer cells: key regulators of placental development (a review). *J Reprod Immunol* 57: 151-168.
149. Red-Horse K, Rivera J, Schanz A, Zhou Y, Winn V, et al. (2006) Cytotrophoblast induction of arterial apoptosis and lymphangiogenesis in an in vivo model of human placentation. *J Clin Invest* 116: 2643-2652.
150. Mol BWJ, Roberts CT, Thangaratinam S, Magee LA, de Groot CJM, et al. (2016) Pre-eclampsia. *Lancet* 387: 999-1011.
151. Uzan J, Carbonnel M, Piconne O, Asmar R, Ayoubi JM (2011) Pre-eclampsia: pathophysiology, diagnosis, and management. *Vasc Health Risk Manag* 7: 467-474.
152. Pennington KA, Schlitt JM, Jackson DL, Schulz LC, Schust DJ (2012) Preeclampsia: multiple approaches for a multifactorial disease. *Dis Model Mech* 5: 9-18.
153. Sharma D, Shastri S, Sharma P (2016) Intrauterine Growth Restriction: Antenatal and Postnatal Aspects. *Clin Med Insights Pediatr* 10: 67-83.
154. Kaufmann P, Black S, Huppertz B (2003) Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod* 69: 1-7.
155. Sharp AN, Heazell AE, Crocker IP, Mor G (2010) Placental apoptosis in health and disease. *Am J Reprod Immunol* 64: 159-169.
156. Garimi G, Salim R (2012) Epidemiology, etiology, diagnosis, and management of placenta accreta. *Obstet Gynecol Int* 2012: 873929.
157. Tseng JJ, Chou MM (2006) Differential expression of growth-, angiogenesis- and invasion-related factors in the development of placenta accreta. *Taiwan J Obstet Gynecol* 45: 100-106.
158. Garimi G, Goldman S, Shalev E, Salim R (2011) The effects of decidual injury on the invasion potential of trophoblastic cells. *Obstet Gynecol* 117: 55-59.
159. Kourtis AP, Read JS, Jamieson DJ (2014) Pregnancy and infection. *N Engl J Med* 370: 2211-2218.
160. Montoya JG, Remington JS (2008) Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin Infect Dis* 47: 554-566.
161. Jones JL, Lopez A, Wilson M, Schulkin J, Gibbs R (2001) Congenital toxoplasmosis: a review. *Obstet Gynecol Surv* 56: 296-305.
162. Best JM (2007) Rubella. *Semin Fetal Neonatal Med* 12: 182-192.
163. Krech U, Tobin J (1981) A collaborative study of cytomegalovirus antibodies in mothers and young children in 19 countries. *Bull World Health Organ* 59: 605-610.
164. Pomeroy C, Englund JA (1987) Cytomegalovirus: epidemiology and infection control. *Am J Infect Control* 15: 107-119.
165. Pereira L, Petitt M, Fong A, Tsuge M, Tabata T, et al. (2014) Intrauterine growth restriction caused by underlying congenital cytomegalovirus infection. *J Infect Dis* 209: 1573-1584.
166. Rauwel B, Mariame B, Martin H, Nielsen R, Allart S, et al. (2010) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by human cytomegalovirus for de novo replication impairs migration and invasiveness of cytotrophoblasts from early placentas. *J Virol* 84: 2946-2954.
167. Cannon MJ (2009) Congenital cytomegalovirus (CMV) epidemiology and awareness. *J Clin Virol* 46 Suppl 4: S6-10.

168. Rolland M, Li X, Sellier Y, Martin H, Perez-Berezo T, et al. (2016) PPARgamma Is Activated during Congenital Cytomegalovirus Infection and Inhibits Neuronogenesis from Human Neural Stem Cells. *PLoS Pathog* 12: e1005547.
169. Gandhi MK, Khanna R (2004) Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *Lancet Infect Dis* 4: 725-738.
170. Anzivino E, Fioriti D, Mischitelli M, Bellizzi A, Barucca V, et al. (2009) Herpes simplex virus infection in pregnancy and in neonate: status of art of epidemiology, diagnosis, therapy and prevention. *Virology* 6: 40.
171. Kim J, Chang DY, Lee HW, Lee H, Kim JH, et al. (2018) Innate-like Cytotoxic Function of Bystander-Activated CD8(+) T Cells Is Associated with Liver Injury in Acute Hepatitis A. *Immunity* 48: 161-173 e165.
172. Sun JC, Beilke JN, Lanier LL (2009) Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature* 457: 557-561.
173. Dranoff G (2004) Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 4: 11-22.
174. Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, Kagan JC (2015) Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu Rev Immunol* 33: 257-290.
175. Spits H, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, et al. (2013) Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol* 13: 145-149.
176. Bonilla FA, Oettgen HC (2010) Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol* 125: S33-40.
177. Kiessling R, Klein E, Pross H, Wigzell H (1975) "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol* 5: 117-121.
178. Kiessling R, Klein E, Wigzell H (1975) "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol* 5: 112-117.
179. Lanier LL, Testi R, Bindl J, Phillips JH (1989) Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med* 169: 2233-2238.
180. Ritz J, Schmidt RE, Michon J, Hercend T, Schlossman SF (1988) Characterization of functional surface structures on human natural killer cells. *Adv Immunol* 42: 181-211.
181. Zhang Y, Wallace DL, de Lara CM, Ghattas H, Asquith B, et al. (2007) In vivo kinetics of human natural killer cells: the effects of ageing and acute and chronic viral infection. *Immunology* 121: 258-265.
182. Ferlazzo G, Thomas D, Lin SL, Goodman K, Morandi B, et al. (2004) The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J Immunol* 172: 1455-1462.
183. Hanna J, Mandelboim O (2007) When killers become helpers. *Trends Immunol* 28: 201-206.
184. Anfossi N, Andre P, Guia S, Falk CS, Roetenck S, et al. (2006) Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* 25: 331-342.
185. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA (2001) The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22: 633-640.
186. Moretta A (2002) Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nat Rev Immunol* 2: 957-964.
187. Vitale M, Della Chiesa M, Carlomagno S, Romagnani C, Thiel A, et al. (2004) The small subset of CD56brightCD16- natural killer cells is selectively responsible for both cell proliferation and interferon-gamma production upon interaction with dendritic cells. *Eur J Immunol* 34: 1715-1722.
188. Freud AG, Caligiuri MA (2006) Human natural killer cell development. *Immunol Rev* 214: 56-72.

189. Huntington ND, Vosshenrich CA, Di Santo JP (2007) Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans. *Nat Rev Immunol* 7: 703-714.
190. Kumar V, Ben-Ezra J, Bennett M, Sonnenfeld G (1979) Natural killer cells in mice treated with 89strontium: normal target-binding cell numbers but inability to kill even after interferon administration. *J Immunol* 123: 1832-1838.
191. Seaman WE, Blackman MA, Gindhart TD, Roubinian JR, Loeb JM, et al. (1978) beta-Estradiol reduces natural killer cells in mice. *J Immunol* 121: 2193-2198.
192. Miller JS, Alley KA, McGlave P (1994) Differentiation of natural killer (NK) cells from human primitive marrow progenitors in a stroma-based long-term culture system: identification of a CD34+7+ NK progenitor. *Blood* 83: 2594-2601.
193. Mrozek E, Anderson P, Caligiuri MA (1996) Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 87: 2632-2640.
194. Yu H, Fehniger TA, Fuchshuber P, Thiel KS, Vivier E, et al. (1998) Flt3 ligand promotes the generation of a distinct CD34(+) human natural killer cell progenitor that responds to interleukin-15. *Blood* 92: 3647-3657.
195. Galy A, Travis M, Cen D, Chen B (1995) Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* 3: 459-473.
196. Zamai L, Ahmad M, Bennett IM, Azzoni L, Alnemri ES, et al. (1998) Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J Exp Med* 188: 2375-2380.
197. Chan A, Hong DL, Atzberger A, Kollnberger S, Filer AD, et al. (2007) CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts. *J Immunol* 179: 89-94.
198. Romagnani C, Juelke K, Falco M, Morandi B, D'Agostino A, et al. (2007) CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation. *J Immunol* 178: 4947-4955.
199. Shilling HG, McQueen KL, Cheng NW, Shizuru JA, Negrin RS, et al. (2003) Reconstitution of NK cell receptor repertoire following HLA-matched hematopoietic cell transplantation. *Blood* 101: 3730-3740.
200. Bjorkstrom NK, Riese P, Heuts F, Andersson S, Fauriat C, et al. (2010) Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood* 116: 3853-3864.
201. Moretta L (2010) Dissecting CD56dim human NK cells. *Blood* 116: 3689-3691.
202. Luevano M, Madrigal A, Saudemont A (2012) Transcription factors involved in the regulation of natural killer cell development and function: an update. *Front Immunol* 3: 319.
203. Gascoyne DM, Long E, Veiga-Fernandes H, de Boer J, Williams O, et al. (2009) The basic leucine zipper transcription factor E4BP4 is essential for natural killer cell development. *Nat Immunol* 10: 1118-1124.
204. Kamizono S, Duncan GS, Seidel MG, Morimoto A, Hamada K, et al. (2009) Nfil3/E4bp4 is required for the development and maturation of NK cells in vivo. *J Exp Med* 206: 2977-2986.
205. Boos MD, Yokota Y, Eberl G, Kee BL (2007) Mature natural killer cell and lymphoid tissue-inducing cell development requires Id2-mediated suppression of E protein activity. *J Exp Med* 204: 1119-1130.
206. Heemskerk MH, Blom B, Nolan G, Stegmann AP, Bakker AQ, et al. (1997) Inhibition of T cell and promotion of natural killer cell development by the dominant negative helix loop helix factor Id3. *J Exp Med* 186: 1597-1602.

207. Gill S, Vasey AE, De Souza A, Baker J, Smith AT, et al. (2012) Rapid development of exhaustion and down-regulation of eomesodermin limit the antitumor activity of adoptively transferred murine natural killer cells. *Blood* 119: 5758-5768.
208. Gordon SM, Chaix J, Rupp LJ, Wu J, Madera S, et al. (2012) The transcription factors T-bet and Eomes control key checkpoints of natural killer cell maturation. *Immunity* 36: 55-67.
209. van Helden MJ, Goossens S, Daussy C, Mathieu AL, Faure F, et al. (2015) Terminal NK cell maturation is controlled by concerted actions of T-bet and Zeb2 and is essential for melanoma rejection. *J Exp Med* 212: 2015-2025.
210. Deng Y, Kerdiles Y, Chu J, Yuan S, Wang Y, et al. (2015) Transcription factor Foxo1 is a negative regulator of natural killer cell maturation and function. *Immunity* 42: 457-470.
211. Ramirez K, Chandler KJ, Spaulding C, Zandi S, Sigvardsson M, et al. (2012) Gene deregulation and chronic activation in natural killer cells deficient in the transcription factor ETS1. *Immunity* 36: 921-932.
212. Narni-Mancinelli E, Jaeger BN, Bernat C, Fenis A, Kung S, et al. (2012) Tuning of natural killer cell reactivity by NKp46 and Helios calibrates T cell responses. *Science* 335: 344-348.
213. Park CS, Lee PH, Yamada T, Burns A, Shen Y, et al. (2012) Kruppel-like factor 4 (KLF4) promotes the survival of natural killer cells and maintains the number of conventional dendritic cells in the spleen. *J Leukoc Biol* 91: 739-750.
214. Samson SI, Richard O, Tavian M, Ranson T, Vosshenrich CA, et al. (2003) GATA-3 promotes maturation, IFN-gamma production, and liver-specific homing of NK cells. *Immunity* 19: 701-711.
215. Baek D, Villen J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, et al. (2008) The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 455: 64-71.
216. Fehniger TA, Wylie T, Germino E, Leong JW, Magrini VJ, et al. (2010) Next-generation sequencing identifies the natural killer cell microRNA transcriptome. *Genome Res* 20: 1590-1604.
217. Bezman NA, Cedars E, Steiner DF, Blelloch R, Hesslein DG, et al. (2010) Distinct requirements of microRNAs in NK cell activation, survival, and function. *J Immunol* 185: 3835-3846.
218. Bezman NA, Chakraborty T, Bender T, Lanier LL (2011) miR-150 regulates the development of NK and iNKT cells. *J Exp Med* 208: 2717-2731.
219. Ng SB, Yan J, Huang G, Selvarajan V, Tay JL, et al. (2011) Dysregulated microRNAs affect pathways and targets of biologic relevance in nasal-type natural killer/T-cell lymphoma. *Blood* 118: 4919-4929.
220. Paik JH, Jang JY, Jeon YK, Kim WY, Kim TM, et al. (2011) MicroRNA-146a downregulates NFkappaB activity via targeting TRAF6 and functions as a tumor suppressor having strong prognostic implications in NK/T cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 17: 4761-4771.
221. Trotta R, Chen L, Ciarlariello D, Josyula S, Mao C, et al. (2012) miR-155 regulates IFN-gamma production in natural killer cells. *Blood* 119: 3478-3485.
222. Yamanaka Y, Tagawa H, Takahashi N, Watanabe A, Guo YM, et al. (2009) Aberrant overexpression of microRNAs activate AKT signaling via down-regulation of tumor suppressors in natural killer-cell lymphoma/leukemia. *Blood* 114: 3265-3275.
223. Castillo EF, Stonier SW, Frasca L, Schluns KS (2009) Dendritic cells support the in vivo development and maintenance of NK cells via IL-15 trans-presentation. *J Immunol* 183: 4948-4956.
224. Guimond M, Freud AG, Mao HC, Yu J, Blaser BW, et al. (2010) In vivo role of Flt3 ligand and dendritic cells in NK cell homeostasis. *J Immunol* 184: 2769-2775.

225. Soderquest K, Powell N, Luci C, van Rooijen N, Hidalgo A, et al. (2011) Monocytes control natural killer cell differentiation to effector phenotypes. *Blood* 117: 4511-4518.
226. Jaeger BN, Donadieu J, Cognet C, Bernat C, Ordonez-Rueda D, et al. (2012) Neutrophil depletion impairs natural killer cell maturation, function, and homeostasis. *J Exp Med* 209: 565-580.
227. Karre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R (1986) Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319: 675-678.
228. Ljunggren HG, Karre K (1990) In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 11: 237-244.
229. Ogasawara K, Benjamin J, Takaki R, Phillips JH, Lanier LL (2005) Function of NKG2D in natural killer cell-mediated rejection of mouse bone marrow grafts. *Nat Immunol* 6: 938-945.
230. Hoglund P, Brodin P (2010) Current perspectives of natural killer cell education by MHC class I molecules. *Nat Rev Immunol* 10: 724-734.
231. Liao NS, Bix M, Zijlstra M, Jaenisch R, Raulet D (1991) MHC class I deficiency: susceptibility to natural killer (NK) cells and impaired NK activity. *Science* 253: 199-202.
232. Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM, Lybarger L, Song YJ, et al. (2005) Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* 436: 709-713.
233. Oppenheim DE, Roberts SJ, Clarke SL, Filler R, Lewis JM, et al. (2005) Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance. *Nat Immunol* 6: 928-937.
234. Wiemann K, Mittrucker HW, Feger U, Welte SA, Yokoyama WM, et al. (2005) Systemic NKG2D down-regulation impairs NK and CD8 T cell responses in vivo. *J Immunol* 175: 720-729.
235. Joncker NT, Fernandez NC, Treiner E, Vivier E, Raulet DH (2009) NK cell responsiveness is tuned commensurate with the number of inhibitory receptors for self-MHC class I: the rheostat model. *J Immunol* 182: 4572-4580.
236. Brodin P, Lakshmikanth T, Johansson S, Karre K, Hoglund P (2009) The strength of inhibitory input during education quantitatively tunes the functional responsiveness of individual natural killer cells. *Blood* 113: 2434-2441.
237. Elliott JM, Wahle JA, Yokoyama WM (2010) MHC class I-deficient natural killer cells acquire a licensed phenotype after transfer into an MHC class I-sufficient environment. *J Exp Med* 207: 2073-2079.
238. Joncker NT, Shifrin N, Delebecque F, Raulet DH (2010) Mature natural killer cells reset their responsiveness when exposed to an altered MHC environment. *J Exp Med* 207: 2065-2072.
239. Boudreau JE, Hsu KC (2018) Natural Killer Cell Education and the Response to Infection and Cancer Therapy: Stay Tuned. *Trends Immunol* 39: 222-239.
240. Chaix J, Tessmer MS, Hoebe K, Fuseri N, Ryffel B, et al. (2008) Cutting edge: Priming of NK cells by IL-18. *J Immunol* 181: 1627-1631.
241. Lucas M, Schachterle W, Oberle K, Aichele P, Diefenbach A (2007) Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity* 26: 503-517.
242. Barrow AD, Trowsdale J (2008) The extended human leukocyte receptor complex: diverse ways of modulating immune responses. *Immunol Rev* 224: 98-123.
243. Renedo M, Arce I, Montgomery K, Roda-Navarro P, Lee E, et al. (2000) A sequence-ready physical map of the region containing the human natural killer gene complex on chromosome 12p12.3-p13.2. *Genomics* 65: 129-136.

244. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, et al. (2011) Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 331: 44-49.
245. Maenaka K, Juji T, Stuart DI, Jones EY (1999) Crystal structure of the human p58 killer cell inhibitory receptor (KIR2DL3) specific for HLA-Cw3-related MHC class I. *Structure* 7: 391-398.
246. Yokoyama WM, Kim S (2006) How do natural killer cells find self to achieve tolerance? *Immunity* 24: 249-257.
247. Barber DF, Long EO (2003) Coexpression of CD58 or CD48 with intercellular adhesion molecule 1 on target cells enhances adhesion of resting NK cells. *J Immunol* 170: 294-299.
248. Marsh SG, Parham P, Dupont B, Geraghty DE, Trowsdale J, et al. (2003) Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Hum Immunol* 64: 648-654.
249. Lanier LL (2008) Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 9: 495-502.
250. Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, et al. (1997) Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity* 7: 753-763.
251. Vendelbosch S, de Boer M, Gouw RA, Ho CK, Geissler J, et al. (2013) Extensive variation in gene copy number at the killer immunoglobulin-like receptor locus in humans. *PLoS One* 8: e67619.
252. Thielens A, Vivier E, Romagne F (2012) NK cell MHC class I specific receptors (KIR): from biology to clinical intervention. *Curr Opin Immunol* 24: 239-245.
253. Faure M, Long EO (2002) KIR2DL4 (CD158d), an NK cell-activating receptor with inhibitory potential. *J Immunol* 168: 6208-6214.
254. Yusa S, Catina TL, Campbell KS (2002) SHP-1- and phosphotyrosine-independent inhibitory signaling by a killer cell Ig-like receptor cytoplasmic domain in human NK cells. *J Immunol* 168: 5047-5057.
255. Kikuchi-Maki A, Yusa S, Catina TL, Campbell KS (2003) KIR2DL4 is an IL-2-regulated NK cell receptor that exhibits limited expression in humans but triggers strong IFN- γ production. *J Immunol* 171: 3415-3425.
256. Parham P (2005) MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol* 5: 201-214.
257. Fan QR, Long EO, Wiley DC (2001) Crystal structure of the human natural killer cell inhibitory receptor KIR2DL1-HLA-Cw4 complex. *Nat Immunol* 2: 452-460.
258. Barten R, Torkar M, Haude A, Trowsdale J, Wilson MJ (2001) Divergent and convergent evolution of NK-cell receptors. *Trends Immunol* 22: 52-57.
259. Wende H, Volz A, Ziegler A (2000) Extensive gene duplications and a large inversion characterize the human leukocyte receptor cluster. *Immunogenetics* 51: 703-713.
260. Torkar M, Haude A, Milne S, Beck S, Trowsdale J, et al. (2000) Arrangement of the ILT gene cluster: a common null allele of the ILT6 gene results from a 6.7-kbp deletion. *Eur J Immunol* 30: 3655-3662.
261. Brown D, Trowsdale J, Allen R (2004) The LILR family: modulators of innate and adaptive immune pathways in health and disease. *Tissue Antigens* 64: 215-225.
262. Jones DC, Rogharian A, Brown DP, Chang C, Allen RL, et al. (2009) Alternative mRNA splicing creates transcripts encoding soluble proteins from most LILR genes. *Eur J Immunol* 39: 3195-3206.
263. LeMaout J, Zafaranloo K, Le Danff C, Carosella ED (2005) HLA-G up-regulates ILT2, ILT3, ILT4, and KIR2DL4 in antigen presenting cells, NK cells, and T cells. *Faseb J* 19: 662-664.

264. Favier B, Lemaoult J, Lesport E, Carosella ED (2010) ILT2/HLA-G interaction impairs NK-cell functions through the inhibition of the late but not the early events of the NK-cell activating synapse. *FASEB J* 24: 689-699.
265. Morel E, Bellon T (2008) HLA class I molecules regulate IFN-gamma production induced in NK cells by target cells, viral products, or immature dendritic cells through the inhibitory receptor ILT2/CD85j. *J Immunol* 181: 2368-2381.
266. Willcox BE, Thomas LM, Bjorkman PJ (2003) Crystal structure of HLA-A2 bound to LIR-1, a host and viral major histocompatibility complex receptor. *Nat Immunol* 4: 913-919.
267. Gruda R, Achdout H, Stern-Ginossar N, Gazit R, Betser-Cohen G, et al. (2007) Intracellular cysteine residues in the tail of MHC class I proteins are crucial for extracellular recognition by leukocyte Ig-like receptor 1. *J Immunol* 179: 3655-3661.
268. Browne H, Smith G, Beck S, Minson T (1990) A complex between the MHC class I homologue encoded by human cytomegalovirus and beta 2 microglobulin. *Nature* 347: 770-772.
269. Chapman TL, Heikeman AP, Bjorkman PJ (1999) The inhibitory receptor LIR-1 uses a common binding interaction to recognize class I MHC molecules and the viral homolog UL18. *Immunity* 11: 603-613.
270. Cosman D, Fanger N, Borges L, Kubin M, Chin W, et al. (1997) A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity* 7: 273-282.
271. Pende D, Parolini S, Pessino A, Sivori S, Augugliaro R, et al. (1999) Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med* 190: 1505-1516.
272. Sivori S, Vitale M, Morelli L, Sanseverino L, Augugliaro R, et al. (1997) p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J Exp Med* 186: 1129-1136.
273. Vitale M, Bottino C, Sivori S, Sanseverino L, Castriconi R, et al. (1998) NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med* 187: 2065-2072.
274. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, et al. (2001) Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 19: 197-223.
275. Costello RT, Sivori S, Marcenaro E, Lafage-Pochitaloff M, Mozziconacci MJ, et al. (2002) Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 99: 3661-3667.
276. Fauriat C, Long EO, Ljunggren HG, Bryceson YT (2010) Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* 115: 2167-2176.
277. Hudspeth K, Silva-Santos B, Mavilio D (2013) Natural cytotoxicity receptors: broader expression patterns and functions in innate and adaptive immune cells. *Front Immunol* 4: 69.
278. Pessino A, Sivori S, Bottino C, Malaspina A, Morelli L, et al. (1998) Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J Exp Med* 188: 953-960.
279. Cantoni C, Bottino C, Vitale M, Pessino A, Augugliaro R, et al. (1999) NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. *J Exp Med* 189: 787-796.
280. Campbell KS, Yusa S, Kikuchi-Maki A, Catina TL (2004) NKp44 triggers NK cell activation through DAP12 association that is not influenced by a putative cytoplasmic inhibitory sequence. *J Immunol* 172: 899-906.

281. Delahaye NF, Rusakiewicz S, Martins I, Menard C, Roux S, et al. (2011) Alternatively spliced NKp30 isoforms affect the prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Nat Med* 17: 700-707.
282. Ferlazzo G, Tsang ML, Moretta L, Melioli G, Steinman RM, et al. (2002) Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med* 195: 343-351.
283. Mandelboim O, Porgador A (2001) NKp46. *Int J Biochem Cell Biol* 33: 1147-1150.
284. Moretta L, Moretta A (2004) Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *EMBO J* 23: 255-259.
285. Narni-Mancinelli E, Gauthier L, Baratin M, Guia S, Fenis A, et al. (2017) Complement factor P is a ligand for the natural killer cell-activating receptor NKp46. *Sci Immunol* 2.
286. Baychelier F, Sennepin A, Ermonval M, Dorgham K, Debre P, et al. (2013) Identification of a cellular ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. *Blood*.
287. Rosental B, Brusilovsky M, Hadad U, Oz D, Appel MY, et al. (2011) Proliferating cell nuclear antigen is a novel inhibitory ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. *J Immunol* 187: 5693-5702.
288. Shemesh A, Brusilovsky M, Hadad U, Teltsh O, Edri A, et al. (2016) Survival in acute myeloid leukemia is associated with NKp44 splice variants. *Oncotarget* 7: 32933-32945.
289. Arnon TI, Lev M, Katz G, Chernobrov Y, Porgador A, et al. (2001) Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30. *Eur J Immunol* 31: 2680-2689.
290. HersHKovitz O, Rosental B, Rosenberg LA, Navarro-Sanchez ME, Jivov S, et al. (2009) NKp44 receptor mediates interaction of the envelope glycoproteins from the West Nile and dengue viruses with NK cells. *J Immunol* 183: 2610-2621.
291. Jarahian M, Watzl C, Fournier P, Arnold A, Djandji D, et al. (2009) Activation of natural killer cells by newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase. *J Virol* 83: 8108-8121.
292. Mandelboim O, Lieberman N, Lev M, Paul L, Arnon TI, et al. (2001) Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* 409: 1055-1060.
293. Mao H, Tu W, Liu Y, Qin G, Zheng J, et al. (2010) Inhibition of human natural killer cell activity by influenza virions and hemagglutinin. *J Virol* 84: 4148-4157.
294. Jarahian M, Fiedler M, Cohnen A, Djandji D, Hammerling GJ, et al. (2011) Modulation of NKp30- and NKp46-mediated natural killer cell responses by poxviral hemagglutinin. *PLoS Pathog* 7: e1002195.
295. Barrow AD, Edeling MA, Trifonov V, Luo J, Goyal P, et al. (2018) Natural Killer Cells Control Tumor Growth by Sensing a Growth Factor. *Cell* 172: 534-548 e519.
296. Brandt CS, Baratin M, Yi EC, Kennedy J, Gao Z, et al. (2009) The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J Exp Med* 206: 1495-1503.
297. Matta J, Baratin M, Chiche L, Forel JM, Cognet C, et al. (2013) Induction of B7-H6, a ligand for the natural killer cell-activating receptor NKp30, in inflammatory conditions. *Blood* 122: 394-404.
298. Bloushtain N, Qimron U, Bar-Ilan A, HersHKovitz O, Gazit R, et al. (2004) Membrane-associated heparan sulfate proteoglycans are involved in the recognition of cellular targets by NKp30 and NKp46. *J Immunol* 173: 2392-2401.
299. Mavoungou E, Held J, Mewono L, Kremsner PG (2007) A Duffy binding-like domain is involved in the NKp30-mediated recognition of *Plasmodium falciparum*-parasitized erythrocytes by natural killer cells. *J Infect Dis* 195: 1521-1531.

300. Pogge von Strandmann E, Simhadri VR, von Tresckow B, Sasse S, Reiners KS, et al. (2007) Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the NKp30 receptor on natural killer cells. *Immunity* 27: 965-974.
301. Arnon TI, Achdout H, Levi O, Markel G, Saleh N, et al. (2005) Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat Immunol* 6: 515-523.
302. Lazetic S, Chang C, Houchins JP, Lanier LL, Phillips JH (1996) Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J Immunol* 157: 4741-4745.
303. Aramburu J, Balboa MA, Izquierdo M, Lopez-Botet M (1991) A novel functional cell surface dimer (Kp43) expressed by natural killer cells and gamma/delta TCR+ T lymphocytes. II. Modulation of natural killer cytotoxicity by anti-Kp43 monoclonal antibody. *J Immunol* 147: 714-721.
304. Aramburu J, Balboa MA, Ramirez A, Silva A, Acevedo A, et al. (1990) A novel functional cell surface dimer (Kp43) expressed by natural killer cells and T cell receptor-gamma/delta+ T lymphocytes. I. Inhibition of the IL-2-dependent proliferation by anti-Kp43 monoclonal antibody. *J Immunol* 144: 3238-3247.
305. Brooks AG, Posch PE, Scorzelli CJ, Borrego F, Coligan JE (1997) NKG2A complexed with CD94 defines a novel inhibitory natural killer cell receptor. *J Exp Med* 185: 795-800.
306. Lanier LL, Corliss B, Wu J, Phillips JH (1998) Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors. *Immunity* 8: 693-701.
307. Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Soderstrom K, D'Andrea A, et al. (1998) HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391: 795-799.
308. Lee N, Llano M, Carretero M, Ishitani A, Navarro F, et al. (1998) HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 5199-5204.
309. Kaiser BK, Barahmand-Pour F, Paulsene W, Medley S, Geraghty DE, et al. (2005) Interactions between NKG2x immunoreceptors and HLA-E ligands display overlapping affinities and thermodynamics. *J Immunol* 174: 2878-2884.
310. Vales-Gomez M, Reyburn HT, Erskine RA, Lopez-Botet M, Strominger JL (1999) Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor CD94/NKG2-C to HLA-E. *Embo J* 18: 4250-4260.
311. Petrie EJ, Clements CS, Lin J, Sullivan LC, Johnson D, et al. (2008) CD94-NKG2A recognition of human leukocyte antigen (HLA)-E bound to an HLA class I leader sequence. *J Exp Med* 205: 725-735.
312. Michaelsson J, Teixeira de Matos C, Achour A, Lanier LL, Karre K, et al. (2002) A signal peptide derived from hsp60 binds HLA-E and interferes with CD94/NKG2A recognition. *J Exp Med* 196: 1403-1414.
313. Tomasec P, Braud VM, Rickards C, Powell MB, McSharpy BP, et al. (2000) Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science* 287: 1031.
314. Wu J, Song Y, Bakker AB, Bauer S, Spies T, et al. (1999) An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 285: 730-732.
315. Lanier LL (2015) NKG2D Receptor and Its Ligands in Host Defense. *Cancer Immunol Res* 3: 575-582.
316. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, et al. (1999) Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285: 727-729.
317. Gilfillan S, Ho EL, Cella M, Yokoyama WM, Colonna M (2002) NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation. *Nat Immunol* 3: 1150-1155.

318. Castriconi R, Cantoni C, Della Chiesa M, Vitale M, Marcenaro E, et al. (2003) Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 4120-4125.
319. Roberts AI, Lee L, Schwarz E, Groh V, Spies T, et al. (2001) NKG2D receptors induced by IL-15 costimulate CD28-negative effector CTL in the tissue microenvironment. *J Immunol* 167: 5527-5530.
320. Bacon L, Eagle RA, Meyer M, Easom N, Young NT, et al. (2004) Two human ULBP/RAET1 molecules with transmembrane regions are ligands for NKG2D. *J Immunol* 173: 1078-1084.
321. Chalupny NJ, Sutherland CL, Lawrence WA, Rein-Weston A, Cosman D (2003) ULBP4 is a novel ligand for human NKG2D. *Biochem Biophys Res Commun* 305: 129-135.
322. Eagle RA, Traherne JA, Hair JR, Jafferji I, Trowsdale J (2009) ULBP6/RAET1L is an additional human NKG2D ligand. *Eur J Immunol* 39: 3207-3216.
323. Metes D, Ernst LK, Chambers WH, Sulica A, Herberman RB, et al. (1998) Expression of functional CD32 molecules on human NK cells is determined by an allelic polymorphism of the FcgammaRIIC gene. *Blood* 91: 2369-2380.
324. Simmons D, Seed B (1988) The Fc gamma receptor of natural killer cells is a phospholipid-linked membrane protein. *Nature* 333: 568-570.
325. Sondermann P, Huber R, Oosthuizen V, Jacob U (2000) The 3.2-A crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc gammaRIII complex. *Nature* 406: 267-273.
326. Zhang Y, Boesen CC, Radaev S, Brooks AG, Fridman WH, et al. (2000) Crystal structure of the extracellular domain of a human Fc gamma RIII. *Immunity* 13: 387-395.
327. Lanier LL, Yu G, Phillips JH (1991) Analysis of Fc gamma RIII (CD16) membrane expression and association with CD3 zeta and Fc epsilon RI-gamma by site-directed mutation. *J Immunol* 146: 1571-1576.
328. Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO (2006) Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev* 214: 73-91.
329. Anumanthan A, Bensussan A, Boumsell L, Christ AD, Blumberg RS, et al. (1998) Cloning of BY55, a novel Ig superfamily member expressed on NK cells, CTL, and intestinal intraepithelial lymphocytes. *J Immunol* 161: 2780-2790.
330. Fons P, Chabot S, Cartwright JE, Lenfant F, L'Faqihi F, et al. (2006) Soluble HLA-G1 inhibits angiogenesis through an apoptotic pathway and by direct binding to CD160 receptor expressed by endothelial cells. *Blood* 108: 2608-2615.
331. Nikolova M, Marie-Cardine A, Boumsell L, Bensussan A (2002) BY55/CD160 acts as a co-receptor in TCR signal transduction of a human circulating cytotoxic effector T lymphocyte subset lacking CD28 expression. *Int Immunol* 14: 445-451.
332. Rey J, Giustiniani J, Mallet F, Schiavon V, Boumsell L, et al. (2006) The co-expression of 2B4 (CD244) and CD160 delineates a subpopulation of human CD8+ T cells with a potent CD160-mediated cytolytic effector function. *Eur J Immunol* 36: 2359-2366.
333. Le Bouteiller P, Barakonyi A, Giustiniani J, Lenfant F, Marie-Cardine A, et al. (2002) Engagement of CD160 receptor by HLA-C is a triggering mechanism used by circulating natural killer (NK) cells to mediate cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 16963-16968.
334. Agrawal S, Marquet J, Freeman GJ, Tawab A, Bouteiller PL, et al. (1999) Cutting edge: MHC class I triggering by a novel cell surface ligand costimulates proliferation of activated human T cells. *J Immunol* 162: 1223-1226.
335. Giustiniani J, Bensussan A, Marie-Cardine A (2009) Identification and characterization of a transmembrane isoform of CD160 (CD160-TM), a unique activating receptor selectively expressed upon human NK cell activation. *J Immunol* 182: 63-71.

336. Barakonyi A, Rabot M, Marie-Cardine A, Aguerre-Girr M, Polgar B, et al. (2004) Cutting edge: engagement of CD160 by its HLA-C physiological ligand triggers a unique cytokine profile secretion in the cytotoxic peripheral blood NK cell subset. *J Immunol* 173: 5349-5354.
337. Tu TC, Brown NK, Kim TJ, Wroblewska J, Yang X, et al. (2015) CD160 is essential for NK-mediated IFN-gamma production. *J Exp Med* 212: 415-429.
338. Scott JL, Dunn SM, Jin B, Hillam AJ, Walton S, et al. (1989) Characterization of a novel membrane glycoprotein involved in platelet activation. *J Biol Chem* 264: 13475-13482.
339. Shibuya A, Campbell D, Hannum C, Yssel H, Franz-Bacon K, et al. (1996) DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity* 4: 573-581.
340. Bottino C, Castriconi R, Pende D, Rivera P, Nanni M, et al. (2003) Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J Exp Med* 198: 557-567.
341. Masson D, Jarry A, Baury B, Blanchardie P, Laboisie C, et al. (2001) Overexpression of the CD155 gene in human colorectal carcinoma. *Gut* 49: 236-240.
342. Long EO, Kim HS, Liu D, Peterson ME, Rajagopalan S (2013) Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annu Rev Immunol* 31: 227-258.
343. Shibuya K, Shirakawa J, Kameyama T, Honda S, Tahara-Hanaoka S, et al. (2003) CD226 (DNAM-1) is involved in lymphocyte function-associated antigen 1 costimulatory signal for naive T cell differentiation and proliferation. *J Exp Med* 198: 1829-1839.
344. Chan CJ, Martinet L, Gilfillan S, Souza-Fonseca-Guimaraes F, Chow MT, et al. (2014) The receptors CD96 and CD226 oppose each other in the regulation of natural killer cell functions. *Nat Immunol* 15: 431-438.
345. Martinet L, Ferrari De Andrade L, Guillerey C, Lee JS, Liu J, et al. (2015) DNAM-1 expression marks an alternative program of NK cell maturation. *Cell Rep* 11: 85-97.
346. Nabekura T, Kanaya M, Shibuya A, Fu G, Gascoigne NR, et al. (2014) Costimulatory molecule DNAM-1 is essential for optimal differentiation of memory natural killer cells during mouse cytomegalovirus infection. *Immunity* 40: 225-234.
347. Schuhmachers G, Ariizumi K, Mathew PA, Bennett M, Kumar V, et al. (1995) 2B4, a new member of the immunoglobulin gene superfamily, is expressed on murine dendritic epidermal T cells and plays a functional role in their killing of skin tumors. *J Invest Dermatol* 105: 592-596.
348. Mathew PA, Garni-Wagner BA, Land K, Takashima A, Stoneman E, et al. (1993) Cloning and characterization of the 2B4 gene encoding a molecule associated with non-MHC-restricted killing mediated by activated natural killer cells and T cells. *J Immunol* 151: 5328-5337.
349. Valiante NM, Trinchieri G (1993) Identification of a novel signal transduction surface molecule on human cytotoxic lymphocytes. *J Exp Med* 178: 1397-1406.
350. Brown MH, Boles K, van der Merwe PA, Kumar V, Mathew PA, et al. (1998) 2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48. *J Exp Med* 188: 2083-2090.
351. Thorley-Lawson DA, Ianelli C, Klamann LD, Staunton D, Yokoyama S (1993) Function of CD48 and its regulation by Epstein-Barr virus. *Biochem Soc Trans* 21: 976-980.
352. Tissot C, Rebouissou C, Klein B, Mechti N (1997) Both human alpha/beta and gamma interferons upregulate the expression of CD48 cell surface molecules. *J Interferon Cytokine Res* 17: 17-26.

353. Betser-Cohen G, Mizrahi S, Elboim M, Alsheich-Bartok O, Mandelboim O (2010) The association of MHC class I proteins with the 2B4 receptor inhibits self-killing of human NK cells. *J Immunol* 184: 2761-2768.
354. Kim EO, Kim TJ, Kim N, Kim ST, Kumar V, et al. (2010) Homotypic cell to cell cross-talk among human natural killer cells reveals differential and overlapping roles of 2B4 and CD2. *J Biol Chem* 285: 41755-41764.
355. Veillette A (2006) Immune regulation by SLAM family receptors and SAP-related adaptors. *Nat Rev Immunol* 6: 56-66.
356. Della Chiesa M, Marcenaro E, Sivori S, Carlomagno S, Pesce S, et al. (2014) Human NK cell response to pathogens. *Semin Immunol* 26: 152-160.
357. Sivori S, Carlomagno S, Pesce S, Moretta A, Vitale M, et al. (2014) TLR/NCR/KIR: Which One to Use and When? *Front Immunol* 5: 105.
358. Sivori S, Falco M, Carlomagno S, Romeo E, Soldani C, et al. (2010) A novel KIR-associated function: evidence that CpG DNA uptake and shuttling to early endosomes is mediated by KIR3DL2. *Blood* 116: 1637-1647.
359. Gregoire C, Chasson L, Luci C, Tomasello E, Geissmann F, et al. (2007) The trafficking of natural killer cells. *Immunol Rev* 220: 169-182.
360. Horejsi V (2004) Transmembrane adaptor proteins in membrane microdomains: important regulators of immunoreceptor signaling. *Immunol Lett* 92: 43-49.
361. McVicar DW, Taylor LS, Gosselin P, Willette-Brown J, Mikhael AI, et al. (1998) DAP12-mediated signal transduction in natural killer cells. A dominant role for the Syk protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* 273: 32934-32942.
362. Brumbaugh KM, Binstadt BA, Billadeau DD, Schoon RA, Dick CJ, et al. (1997) Functional role for Syk tyrosine kinase in natural killer cell-mediated natural cytotoxicity. *J Exp Med* 186: 1965-1974.
363. Jiang K, Zhong B, Gilvary DL, Corliss BC, Hong-Geller E, et al. (2000) Pivotal role of phosphoinositide-3 kinase in regulation of cytotoxicity in natural killer cells. *Nat Immunol* 1: 419-425.
364. Jiang K, Zhong B, Gilvary DL, Corliss BC, Vivier E, et al. (2002) Syk regulation of phosphoinositide 3-kinase-dependent NK cell function. *J Immunol* 168: 3155-3164.
365. Turnbull IR, Colonna M (2007) Activating and inhibitory functions of DAP12. *Nat Rev Immunol* 7: 155-161.
366. MacFarlane AWt, Campbell KS (2006) Signal transduction in natural killer cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 298: 23-57.
367. Vivier E, Nunes JA, Vely F (2004) Natural killer cell signaling pathways. *Science* 306: 1517-1519.
368. Jiang K, Zhong B, Ritchey C, Gilvary DL, Hong-Geller E, et al. (2003) Regulation of Akt-dependent cell survival by Syk and Rac. *Blood* 101: 236-244.
369. Chang LC, Wang JP (1999) Examination of the signal transduction pathways leading to activation of extracellular signal-regulated kinase by formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine in rat neutrophils. *FEBS Lett* 454: 165-168.
370. Wu C (1999) Integrin-linked kinase and PINCH: partners in regulation of cell-extracellular matrix interaction and signal transduction. *J Cell Sci* 112 (Pt 24): 4485-4489.
371. Wu J, Cherwinski H, Spies T, Phillips JH, Lanier LL (2000) DAP10 and DAP12 form distinct, but functionally cooperative, receptor complexes in natural killer cells. *J Exp Med* 192: 1059-1068.
372. Cella M, Fujikawa K, Tassi I, Kim S, Latinis K, et al. (2004) Differential requirements for Vav proteins in DAP10- and ITAM-mediated NK cell cytotoxicity. *J Exp Med* 200: 817-823.

373. Morra M, Lu J, Poy F, Martin M, Sayos J, et al. (2001) Structural basis for the interaction of the free SH2 domain EAT-2 with SLAM receptors in hematopoietic cells. *Embo J* 20: 5840-5852.
374. Sayos J, Nguyen KB, Wu C, Stepp SE, Howie D, et al. (2000) Potential pathways for regulation of NK and T cell responses: differential X-linked lymphoproliferative syndrome gene product SAP interactions with SLAM and 2B4. *Int Immunol* 12: 1749-1757.
375. Latour S, Veillette A (2001) Proximal protein tyrosine kinases in immunoreceptor signaling. *Curr Opin Immunol* 13: 299-306.
376. Roncagalli R, Taylor JE, Zhang S, Shi X, Chen R, et al. (2005) Negative regulation of natural killer cell function by EAT-2, a SAP-related adaptor. *Nat Immunol* 6: 1002-1010.
377. Davidson D, Shi X, Zhang S, Wang H, Nemer M, et al. (2004) Genetic evidence linking SAP, the X-linked lymphoproliferative gene product, to Src-related kinase FynT in T(H)2 cytokine regulation. *Immunity* 21: 707-717.
378. Tangye SG, Phillips JH, Lanier LL, Nichols KE (2000) Functional requirement for SAP in 2B4-mediated activation of human natural killer cells as revealed by the X-linked lymphoproliferative syndrome. *J Immunol* 165: 2932-2936.
379. Bruhns P, Marchetti P, Fridman WH, Vivier E, Daeron M (1999) Differential roles of N- and C-terminal immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs during inhibition of cell activation by killer cell inhibitory receptors. *J Immunol* 162: 3168-3175.
380. Ravetch JV, Lanier LL (2000) Immune inhibitory receptors. *Science* 290: 84-89.
381. Coxon CH, Geer MJ, Senis YA (2017) ITIM receptors: more than just inhibitors of platelet activation. *Blood* 129: 3407-3418.
382. Orange JS (2008) Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nat Rev Immunol* 8: 713-725.
383. Mukherjee M, Mace EM, Carisey AF, Ahmed N, Orange JS (2017) Quantitative Imaging Approaches to Study the CAR Immunological Synapse. *Mol Ther* 25: 1757-1768.
384. Inoue H, Miyaji M, Kosugi A, Nagafuku M, Okazaki T, et al. (2002) Lipid rafts as the signaling scaffold for NK cell activation: tyrosine phosphorylation and association of LAT with phosphatidylinositol 3-kinase and phospholipase C-gamma following CD2 stimulation. *Eur J Immunol* 32: 2188-2198.
385. Orange JS, Harris KE, Andzelm MM, Valter MM, Geha RS, et al. (2003) The mature activating natural killer cell immunologic synapse is formed in distinct stages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 14151-14156.
386. Vyas YM, Mehta KM, Morgan M, Maniar H, Butros L, et al. (2001) Spatial organization of signal transduction molecules in the NK cell immune synapses during MHC class I-regulated noncytolytic and cytolytic interactions. *J Immunol* 167: 4358-4367.
387. Bryceson YT, March ME, Barber DF, Ljunggren HG, Long EO (2005) Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells. *J Exp Med* 202: 1001-1012.
388. Matsumoto G, Nghiem MP, Nozaki N, Schmits R, Penninger JM (1998) Cooperation between CD44 and LFA-1/CD11a adhesion receptors in lymphokine-activated killer cell cytotoxicity. *J Immunol* 160: 5781-5789.
389. Andzelm MM, Chen X, Krzewski K, Orange JS, Strominger JL (2007) Myosin IIA is required for cytolytic granule exocytosis in human NK cells. *J Exp Med* 204: 2285-2291.
390. Roda-Navarro P, Mittelbrunn M, Ortega M, Howie D, Terhorst C, et al. (2004) Dynamic redistribution of the activating 2B4/SAP complex at the cytotoxic NK cell immune synapse. *J Immunol* 173: 3640-3646.

391. Chen X, Allan DS, Krzewski K, Ge B, Kopcow H, et al. (2006) CD28-stimulated ERK2 phosphorylation is required for polarization of the microtubule organizing center and granules in YTS NK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 10346-10351.
392. Wulfig C, Purtic B, Klem J, Schatzle JD (2003) Stepwise cytoskeletal polarization as a series of checkpoints in innate but not adaptive cytolytic killing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7767-7772.
393. Menager MM, Menasche G, Romao M, Knapnougel P, Ho CH, et al. (2007) Secretory cytotoxic granule maturation and exocytosis require the effector protein hMunc13-4. *Nat Immunol* 8: 257-267.
394. Cohnen A, Chiang SC, Stojanovic A, Schmidt H, Claus M, et al. (2013) Surface CD107a/LAMP-1 protects natural killer cells from degranulation-associated damage. *Blood* 122: 1411-1418.
395. Alter G, Malenfant JM, Altfeld M (2004) CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods* 294: 15-22.
396. Blott EJ, Griffiths GM (2002) Secretory lysosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 122-131.
397. Krzewski K, Coligan JE (2012) Human NK cell lytic granules and regulation of their exocytosis. *Front Immunol* 3: 335.
398. Morvan MG, Lanier LL (2016) NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat Rev Cancer* 16: 7-19.
399. Ojcius DM, Persechini PM, Zheng LM, Notaroberto PC, Adeodato SC, et al. (1991) Cytolytic and ion channel-forming properties of the N terminus of lymphocyte perforin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 4621-4625.
400. Salcedo TW, Azzoni L, Wolf SF, Perussia B (1993) Modulation of perforin and granzyme messenger RNA expression in human natural killer cells. *J Immunol* 151: 2511-2520.
401. Thierry J, Keefe D, Boulant S, Boucrot E, Walch M, et al. (2011) Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells. *Nat Immunol* 12: 770-777.
402. Nakajima H, Park HL, Henkart PA (1995) Synergistic roles of granzymes A and B in mediating target cell death by rat basophilic leukemia mast cell tumors also expressing cytolysin/perforin. *J Exp Med* 181: 1037-1046.
403. Beresford PJ, Xia Z, Greenberg AH, Lieberman J (1999) Granzyme A loading induces rapid cytolysis and a novel form of DNA damage independently of caspase activation. *Immunity* 10: 585-594.
404. Zhang D, Beresford PJ, Greenberg AH, Lieberman J (2001) Granzymes A and B directly cleave lamins and disrupt the nuclear lamina during granule-mediated cytolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 5746-5751.
405. Irmier M, Hertig S, MacDonald HR, Sadoul R, Becherer JD, et al. (1995) Granzyme A is an interleukin 1 beta-converting enzyme. *J Exp Med* 181: 1917-1922.
406. Martinvalet D, Dykxhoorn DM, Ferrini R, Lieberman J (2008) Granzyme A cleaves a mitochondrial complex I protein to initiate caspase-independent cell death. *Cell* 133: 681-692.
407. Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J (2005) Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* 22: 355-370.
408. Thomas DA, Scorrano L, Putcha GV, Korsmeyer SJ, Ley TJ (2001) Granzyme B can cause mitochondrial depolarization and cell death in the absence of BID, BAX, and BAK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 14985-14990.
409. Darmon AJ, Nicholson DW, Bleackley RC (1995) Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature* 377: 446-448.

410. Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, Ellisman MH, Latterich M, et al. (2002) Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 111: 331-342.
411. Sutton VR, Wowk ME, Cancilla M, Trapani JA (2003) Caspase activation by granzyme B is indirect, and caspase autoprocessing requires the release of proapoptotic mitochondrial factors. *Immunity* 18: 319-329.
412. Hiebert PR, Granville DJ (2012) Granzyme B in injury, inflammation, and repair. *Trends Mol Med* 18: 732-741.
413. Krensky AM, Clayberger C (2005) Granulysin: a novel host defense molecule. *Am J Transplant* 5: 1789-1792.
414. Pena SV, Hanson DA, Carr BA, Goralski TJ, Krensky AM (1997) Processing, subcellular localization, and function of 519 (granulysin), a human late T cell activation molecule with homology to small, lytic, granule proteins. *J Immunol* 158: 2680-2688.
415. Pena SV, Krensky AM (1997) Granulysin, a new human cytolytic granule-associated protein with possible involvement in cell-mediated cytotoxicity. *Semin Immunol* 9: 117-125.
416. Kaspar AA, Okada S, Kumar J, Poulain FR, Drouvalakis KA, et al. (2001) A distinct pathway of cell-mediated apoptosis initiated by granulysin. *J Immunol* 167: 350-356.
417. Okada S, Li Q, Whitin JC, Clayberger C, Krensky AM (2003) Intracellular mediators of granulysin-induced cell death. *J Immunol* 171: 2556-2562.
418. Gamen S, Hanson DA, Kaspar A, Naval J, Krensky AM, et al. (1998) Granulysin-induced apoptosis. I. Involvement of at least two distinct pathways. *J Immunol* 161: 1758-1764.
419. Ghosh D, Lippert D, Krokhin O, Cortens JP, Wilkins JA (2010) Defining the membrane proteome of NK cells. *J Mass Spectrom* 45: 1-25.
420. Scott FL, Stec B, Pop C, Dobaczewska MK, Lee JJ, et al. (2009) The Fas-FADD death domain complex structure unravels signalling by receptor clustering. *Nature* 457: 1019-1022.
421. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, et al. (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* 14: 5579-5588.
422. Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ, et al. (2000) Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* 12: 611-620.
423. Lee SD, Kuo WW, Lin JA, Chu YF, Wang CK, et al. (2007) Effects of long-term intermittent hypoxia on mitochondrial and Fas death receptor dependent apoptotic pathways in rat hearts. *Int J Cardiol* 116: 348-356.
424. MacFarlane M, Merrison W, Dinsdale D, Cohen GM (2000) Active caspases and cleaved cytokeratins are sequestered into cytoplasmic inclusions in TRAIL-induced apoptosis. *J Cell Biol* 148: 1239-1254.
425. Derakhshan A, Chen Z, Van Waes C (2017) Therapeutic Small Molecules Target Inhibitor of Apoptosis Proteins in Cancers with Dereglulation of Extrinsic and Intrinsic Cell Death Pathways. *Clin Cancer Res* 23: 1379-1387.
426. Jost PJ, Grabow S, Gray D, McKenzie MD, Nachbur U, et al. (2009) XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature* 460: 1035-1039.
427. Vogler M, Durr K, Jovanovic M, Debatin KM, Fulda S (2007) Regulation of TRAIL-induced apoptosis by XIAP in pancreatic carcinoma cells. *Oncogene* 26: 248-257.
428. Legler DF, Micheau O, Doucey MA, Tschopp J, Bron C (2003) Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNF α -mediated NF-kappaB activation. *Immunity* 18: 655-664.

429. Schneider-Brachert W, Tchikov V, Neumeyer J, Jakob M, Winoto-Morbach S, et al. (2004) Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptosomes as death signaling vesicles. *Immunity* 21: 415-428.
430. Lee EW, Kim JH, Ahn YH, Seo J, Ko A, et al. (2012) Ubiquitination and degradation of the FADD adaptor protein regulate death receptor-mediated apoptosis and necroptosis. *Nat Commun* 3: 978.
431. Zingoni A, Sornasse T, Cocks BG, Tanaka Y, Santoni A, et al. (2005) NK cell regulation of T cell-mediated responses. *Mol Immunol* 42: 451-454.
432. Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, Marchesini V, Carra G, et al. (2002) Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* 195: 327-333.
433. Mocikat R, Braumuller H, Gumy A, Egeter O, Ziegler H, et al. (2003) Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. *Immunity* 19: 561-569.
434. Piccioli D, Sbrana S, Melandri E, Valiante NM (2002) Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med* 195: 335-341.
435. Adam C, King S, Allgeier T, Braumuller H, Luking C, et al. (2005) DC-NK cell cross talk as a novel CD4+ T-cell-independent pathway for antitumor CTL induction. *Blood* 106: 338-344.
436. Bajenoff M, Breart B, Huang AY, Qi H, Cazareth J, et al. (2006) Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging. *J Exp Med* 203: 619-631.
437. Martin-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, Gerard C, Lipp M, et al. (2004) Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol* 5: 1260-1265.
438. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, et al. (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25: 677-686.
439. Passos ST, Silver JS, O'Hara AC, Sehy D, Stumhofer JS, et al. (2010) IL-6 promotes NK cell production of IL-17 during toxoplasmosis. *J Immunol* 184: 1776-1783.
440. Perona-Wright G, Mohrs K, Szaba FM, Kummer LW, Madan R, et al. (2009) Systemic but not local infections elicit immunosuppressive IL-10 production by natural killer cells. *Cell Host Microbe* 6: 503-512.
441. Janeway CA, Jr. (2001) How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect* 3: 1167-1171.
442. Walzer T, Dalod M, Vivier E, Zitvogel L (2005) Natural killer cell-dendritic cell crosstalk in the initiation of immune responses. *Expert Opin Biol Ther* 5 Suppl 1: S49-59.
443. Robertson MJ (2002) Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J Leukoc Biol* 71: 173-183.
444. O'Leary JG, Goodarzi M, Drayton DL, von Andrian UH (2006) T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat Immunol* 7: 507-516.
445. Arase H, Mocarski ES, Campbell AE, Hill AB, Lanier LL (2002) Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science* 296: 1323-1326.
446. Brown MG, Dokun AO, Heusel JW, Smith HR, Beckman DL, et al. (2001) Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection. *Science* 292: 934-937.
447. Reeves RK, Li H, Jost S, Blass E, Schafer JL, et al. (2015) Antigen-specific NK cell memory in rhesus macaques. *Nat Immunol* 16: 927-932.

448. Foley B, Cooley S, Verneris MR, Curtsinger J, Luo X, et al. (2012) Human cytomegalovirus (CMV)-induced memory-like NKG2C(+) NK cells are transplantable and expand in vivo in response to recipient CMV antigen. *J Immunol* 189: 5082-5088.
449. Lopez-Verges S, Milush JM, Schwartz BS, Pando MJ, Jarjoura J, et al. (2011) Expansion of a unique CD57(+)NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 14725-14732.
450. Cooper MA, Elliott JM, Keyel PA, Yang L, Carrero JA, et al. (2009) Cytokine-induced memory-like natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 1915-1919.
451. Romee R, Schneider SE, Leong JW, Chase JM, Keppel CR, et al. (2012) Cytokine activation induces human memory-like NK cells. *Blood* 120: 4751-4760.
452. Romee R, Rosario M, Berrien-Elliott MM, Wagner JA, Jewell BA, et al. (2016) Cytokine-induced memory-like natural killer cells exhibit enhanced responses against myeloid leukemia. *Sci Transl Med* 8: 357ra123.
453. Gorelik E, Wiltrot RH, Okumura K, Habu S, Herberman RB (1982) Role of NK cells in the control of metastatic spread and growth of tumor cells in mice. *Int J Cancer* 30: 107-112.
454. Talmadge JE, Meyers KM, Prieur DJ, Starkey JR (1980) Role of natural killer cells in tumor growth and metastasis: C57BL/6 normal and beige mice. *J Natl Cancer Inst* 65: 929-935.
455. Coca S, Perez-Piqueras J, Martinez D, Colmenarejo A, Saez MA, et al. (1997) The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 79: 2320-2328.
456. Guerra N, Tan YX, Joncker NT, Choy A, Gallardo F, et al. (2008) NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity* 28: 571-580.
457. Hayashi T, Imai K, Morishita Y, Hayashi I, Kusunoki Y, et al. (2006) Identification of the NKG2D haplotypes associated with natural cytotoxic activity of peripheral blood lymphocytes and cancer immunosurveillance. *Cancer Res* 66: 563-570.
458. Shafi S, Vantourout P, Wallace G, Antoun A, Vaughan R, et al. (2011) An NKG2D-mediated human lymphoid stress surveillance response with high interindividual variation. *Sci Transl Med* 3: 113ra124.
459. Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K (2000) Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* 356: 1795-1799.
460. Lakshmikanth T, Burke S, Ali TH, Kimpfler S, Ursini F, et al. (2009) NCRs and DNAM-1 mediate NK cell recognition and lysis of human and mouse melanoma cell lines in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 119: 1251-1263.
461. Glasner A, Ghadially H, Gur C, Stanietzky N, Tsukerman P, et al. (2012) Recognition and prevention of tumor metastasis by the NK receptor NKp46/NCR1. *J Immunol* 188: 2509-2515.
462. Halfteck GG, Elboim M, Gur C, Achdout H, Ghadially H, et al. (2009) Enhanced in vivo growth of lymphoma tumors in the absence of the NK-activating receptor NKp46/NCR1. *J Immunol* 182: 2221-2230.
463. Shemesh A, Kundu K, Peleg R, Yossef R, Kaplanov I, et al. (2018) NKp44-Derived Peptide Binds Proliferating Cell Nuclear Antigen and Mediates Tumor Cell Death. *Front Immunol* 9: 1114.
464. Tarek N, Le Luque JB, Gallagher MM, Zheng J, Venstrom JM, et al. (2013) Unlicensed NK cells target neuroblastoma following anti-GD2 antibody treatment. *J Clin Invest* 122: 3260-3270.
465. Rautela J, Huntington ND (2017) IL-15 signaling in NK cell cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 44: 1-6.

466. Rosenberg SA (2014) IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer. *J Immunol* 192: 5451-5458.
467. Deckert J, Park PU, Chicklas S, Yi Y, Li M, et al. (2013) A novel anti-CD37 antibody-drug conjugate with multiple anti-tumor mechanisms for the treatment of B-cell malignancies. *Blood*.
468. Rudnicka D, Oszmiana A, Finch DK, Strickland I, Schofield DJ, et al. (2013) Rituximab causes a polarization of B cells that augments its therapeutic function in NK-cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Blood* 121: 4694-4702.
469. Chen Z, Chen L, Baker K, Olszak T, Zeissig S, et al. (2011) CEACAM1 dampens antitumor immunity by down-regulating NKG2D ligand expression on tumor cells. *J Exp Med* 208: 2633-2640.
470. Bossard C, Bezieau S, Matysiak-Budnik T, Volteau C, Laboisie CL, et al. (2012) HLA-E/beta2 microglobulin overexpression in colorectal cancer is associated with recruitment of inhibitory immune cells and tumor progression. *Int J Cancer* 131: 855-863.
471. Lauden L, Siewiera J, Boukouaci W, Ramgolam K, Mourah S, et al. (2014) TGF-beta-induced (TGFB1) protein in melanoma: a signature of high metastatic potential. *J Invest Dermatol* 134: 1675-1685.
472. Sato N, Saga Y, Mizukami H, Wang D, Takahashi S, et al. (2012) Downregulation of indoleamine-2,3-dioxygenase in cervical cancer cells suppresses tumor growth by promoting natural killer cell accumulation. *Oncol Rep* 28: 1574-1578.
473. Szkaradkiewicz A, Karpinski TM, Drews M, Borejsza-Wysocki M, Majewski P, et al. (2010) Natural killer cell cytotoxicity and immunosuppressive cytokines (IL-10, TGF-beta1) in patients with gastric cancer. *J Biomed Biotechnol* 2010: 901564.
474. Vyas M, Reinartz S, Hoffmann N, Reiners KS, Lieber S, et al. (2017) Soluble NKG2D ligands in the ovarian cancer microenvironment are associated with an adverse clinical outcome and decreased memory effector T cells independent of NKG2D downregulation. *Oncoimmunology* 6: e1339854.
475. Zhang J, Basher F, Wu JD (2015) NKG2D Ligands in Tumor Immunity: Two Sides of a Coin. *Front Immunol* 6: 97.
476. Gagne K, Busson M, Balere-Appert ML, Absi L, Jollet I, et al. (2007) Relevance of KIR gene matching in unrelated hematopoietic stem cell transplantations. *Tissue Antigens* 69 Suppl 1: 118-122.
477. Hankey KG, Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Klassen DK, Philosophe B, et al. (2002) MIC expression in renal and pancreatic allografts. *Transplantation* 73: 304-306.
478. Kondo T, Morita K, Watarai Y, Auerbach MB, Taub DD, et al. (2000) Early increased chemokine expression and production in murine allogeneic skin grafts is mediated by natural killer cells. *Transplantation* 69: 969-977.
479. Obara H, Nagasaki K, Hsieh CL, Ogura Y, Esquivel CO, et al. (2005) IFN-gamma, produced by NK cells that infiltrate liver allografts early after transplantation, links the innate and adaptive immune responses. *Am J Transplant* 5: 2094-2103.
480. Lopez-Botet M, Vilches C, Redondo-Pachon D, Muntasell A, Pupuleku A, et al. (2017) Dual Role of Natural Killer Cells on Graft Rejection and Control of Cytomegalovirus Infection in Renal Transplantation. *Front Immunol* 8: 166.
481. Boukouaci W, Lauden L, Siewiera J, Dam N, Hocine HR, et al. (2014) Natural killer cell crosstalk with allogeneic human cardiac-derived stem/progenitor cells controls persistence. *Cardiovasc Res* 104: 290-302.
482. Maroof A, Beattie L, Zubairi S, Svensson M, Stager S, et al. (2008) Posttranscriptional regulation of Il10 gene expression allows natural killer cells to express immunoregulatory function. *Immunity* 29: 295-305.

483. Laffont S, Seillet C, Ortaldo J, Coudert JD, Guery JC (2008) Natural killer cells recruited into lymph nodes inhibit alloreactive T-cell activation through perforin-mediated killing of donor allogeneic dendritic cells. *Blood* 112: 661-671.
484. Yu G, Xu X, Vu MD, Kilpatrick ED, Li XC (2006) NK cells promote transplant tolerance by killing donor antigen-presenting cells. *J Exp Med* 203: 1851-1858.
485. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, et al. (2002) Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 295: 2097-2100.
486. Giebel S, Locatelli F, Lamparelli T, Velardi A, Davies S, et al. (2003) Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood* 102: 814-819.
487. Biron CA, Byron KS, Sullivan JL (1989) Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N Engl J Med* 320: 1731-1735.
488. Orange JS (2002) Human natural killer cell deficiencies and susceptibility to infection. *Microbes Infect* 4: 1545-1558.
489. Zitvogel L (2002) Dendritic and natural killer cells cooperate in the control/switch of innate immunity. *J Exp Med* 195: F9-14.
490. Yokoyama WM (2005) Specific and non-specific natural killer cell responses to viral infection. *Adv Exp Med Biol* 560: 57-61.
491. Guma M, Angulo A, Vilches C, Gomez-Lozano N, Malats N, et al. (2004) Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood* 104: 3664-3671.
492. Guma M, Budt M, Saez A, Brckalo T, Hengel H, et al. (2006) Expansion of CD94/NKG2C+ NK cells in response to human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *Blood* 107: 3624-3631.
493. Foley B, Cooley S, Verneris MR, Pitt M, Curtsinger J, et al. (2012) Cytomegalovirus reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C+ natural killer cells with potent function. *Blood* 119: 2665-2674.
494. Cook M, Briggs D, Craddock C, Mahendra P, Milligan D, et al. (2006) Donor KIR genotype has a major influence on the rate of cytomegalovirus reactivation following T-cell replete stem cell transplantation. *Blood* 107: 1230-1232.
495. Stern M, Elsasser H, Honger G, Steiger J, Schaub S, et al. (2008) The number of activating KIR genes inversely correlates with the rate of CMV infection/reactivation in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 8: 1312-1317.
496. Beziat V, Dalgard O, Asselah T, Halfon P, Bedossa P, et al. (2012) CMV drives clonal expansion of NKG2C+ NK cells expressing self-specific KIRs in chronic hepatitis patients. *Eur J Immunol* 42: 447-457.
497. Magri G, Muntasell A, Romo N, Saez-Borderias A, Pende D, et al. (2011) NKp46 and DNAM-1 NK-cell receptors drive the response to human cytomegalovirus-infected myeloid dendritic cells overcoming viral immune evasion strategies. *Blood* 117: 848-856.
498. Williams H, McAulay K, Macsween KF, Gallacher NJ, Higgins CD, et al. (2005) The immune response to primary EBV infection: a role for natural killer cells. *Br J Haematol* 129: 266-274.
499. Shaw RK, Issekutz AC, Fraser R, Schmit P, Morash B, et al. (2012) Bilateral adrenal EBV-associated smooth muscle tumors in a child with a natural killer cell deficiency. *Blood* 119: 4009-4012.
500. Chijioko O, Azzi T, Nadal D, Munz C (2013) Innate immune responses against Epstein Barr virus infection. *J Leukoc Biol*.

501. Pappworth IY, Wang EC, Rowe M (2007) The switch from latent to productive infection in epstein-barr virus-infected B cells is associated with sensitization to NK cell killing. *J Virol* 81: 474-482.
502. Moir S, Chun TW, Fauci AS (2011) Pathogenic mechanisms of HIV disease. *Annu Rev Pathol* 6: 223-248.
503. Flores-Villanueva PO, Yunis EJ, Delgado JC, Vittinghoff E, Buchbinder S, et al. (2001) Control of HIV-1 viremia and protection from AIDS are associated with HLA-Bw4 homozygosity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 5140-5145.
504. Martin MP, Gao X, Lee JH, Nelson GW, Detels R, et al. (2002) Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet* 31: 429-434.
505. Martin MP, Qi Y, Gao X, Yamada E, Martin JN, et al. (2007) Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. *Nat Genet* 39: 733-740.
506. Ramsuran V, Naranbhai V, Horowitz A, Qi Y, Martin MP, et al. (2018) Elevated HLA-A expression impairs HIV control through inhibition of NKG2A-expressing cells. *Science* 359: 86-90.
507. Bjorkstrom NK, Ljunggren HG, Sandberg JK (2010) CD56 negative NK cells: origin, function, and role in chronic viral disease. *Trends Immunol* 31: 401-406.
508. Mavilio D, Lombardo G, Benjamin J, Kim D, Follman D, et al. (2005) Characterization of CD56-/CD16+ natural killer (NK) cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 2886-2891.
509. Ripa M, Pogliaghi M, Chiappetta S, Galli L, Pensieroso S, et al. (2015) Dynamics of adaptive and innate immunity in patients treated during primary human immunodeficiency virus infection: results from Maraviroc in HIV Acute Infection (MAIN) randomized clinical trial. *Clin Microbiol Infect* 21: 876 e871-874.
510. Alter G, Teigen N, Davis BT, Addo MM, Suscovich TJ, et al. (2005) Sequential deregulation of NK cell subset distribution and function starting in acute HIV-1 infection. *Blood* 106: 3366-3369.
511. Mavilio D, Benjamin J, Daucher M, Lombardo G, Kottlil S, et al. (2003) Natural killer cells in HIV-1 infection: dichotomous effects of viremia on inhibitory and activating receptors and their functional correlates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 15011-15016.
512. De Maria A, Fogli M, Costa P, Murdaca G, Puppo F, et al. (2003) The impaired NK cell cytolytic function in viremic HIV-1 infection is associated with a reduced surface expression of natural cytotoxicity receptors (NKp46, NKp30 and NKp44). *Eur J Immunol* 33: 2410-2418.
513. Vieillard V, Strominger JL, Debre P (2005) NK cytotoxicity against CD4+ T cells during HIV-1 infection: a gp41 peptide induces the expression of an NKp44 ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 10981-10986.
514. Doherty DG, O'Farrelly C (2000) Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. *Immunol Rev* 174: 5-20.
515. Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, et al. (2004) HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 305: 872-874.
516. Vidal-Castineira JR, Lopez-Vazquez A, Diaz-Pena R, Alonso-Arias R, Martinez-Borra J, et al. (2010) Effect of killer immunoglobulin-like receptors in the response to combined treatment in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Virol* 84: 475-481.
517. Cheent K, Khakoo SI (2011) Natural killer cells and hepatitis C: action and reaction. *Gut* 60: 268-278.

518. Nattermann J, Nischalke HD, Hofmeister V, Ahlenstiel G, Zimmermann H, et al. (2005) The HLA-A2 restricted T cell epitope HCV core 35-44 stabilizes HLA-E expression and inhibits cytolysis mediated by natural killer cells. *Am J Pathol* 166: 443-453.
519. Golden-Mason L, Cox AL, Randall JA, Cheng L, Rosen HR (2010) Increased natural killer cell cytotoxicity and NKp30 expression protects against hepatitis C virus infection in high-risk individuals and inhibits replication in vitro. *Hepatology* 52: 1581-1589.
520. Kramer B, Korner C, Kebschull M, Glassner A, Eisenhardt M, et al. (2012) Natural killer p46High expression defines a natural killer cell subset that is potentially involved in control of hepatitis C virus replication and modulation of liver fibrosis. *Hepatology* 56: 1201-1213.
521. Strunz B, Hengst J, Deterding K, Manns MP, Cornberg M, et al. (2018) Chronic hepatitis C virus infection irreversibly impacts human natural killer cell repertoire diversity. *Nat Commun* 9: 2275.
522. Thomas PG, Brown SA, Yue W, So J, Webby RJ, et al. (2006) An unexpected antibody response to an engineered influenza virus modifies CD8+ T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 2764-2769.
523. Liu B, Mori I, Hossain MJ, Dong L, Takeda K, et al. (2004) Interleukin-18 improves the early defence system against influenza virus infection by augmenting natural killer cell-mediated cytotoxicity. *J Gen Virol* 85: 423-428.
524. Jegerlehner A, Schmitz N, Storni T, Bachmann MF (2004) Influenza A vaccine based on the extracellular domain of M2: weak protection mediated via antibody-dependent NK cell activity. *J Immunol* 172: 5598-5605.
525. Draghi M, Pashine A, Sanjanwala B, Gendzekhadze K, Cantoni C, et al. (2007) NKp46 and NKG2D recognition of infected dendritic cells is necessary for NK cell activation in the human response to influenza infection. *J Immunol* 178: 2688-2698.
526. Owen RE, Yamada E, Thompson CI, Phillipson LJ, Thompson C, et al. (2007) Alterations in receptor binding properties of recent human influenza H3N2 viruses are associated with reduced natural killer cell lysis of infected cells. *J Virol* 81: 11170-11178.
527. Esin S, Counoupas C, Aulicino A, Brancatisano FL, Maisetta G, et al. (2013) Interaction of Mycobacterium tuberculosis cell wall components with the human natural killer cell receptors NKp44 and Toll-like receptor 2. *Scand J Immunol* 77: 460-469.
528. Marcenaro E, Ferranti B, Falco M, Moretta L, Moretta A (2008) Human NK cells directly recognize Mycobacterium bovis via TLR2 and acquire the ability to kill monocyte-derived DC. *Int Immunol* 20: 1155-1167.
529. Souza-Fonseca-Guimaraes F, Adib-Conquy M, Cavaillon JM (2012) Natural killer (NK) cells in antibacterial innate immunity: angels or devils? *Mol Med* 18: 270-285.
530. Souza-Fonseca-Guimaraes F, Parlato M, Philippart F, Misset B, Cavaillon JM, et al. (2012) Toll-like receptors expression and interferon-gamma production by NK cells in human sepsis. *Crit Care* 16: R206.
531. Vankayalapati R, Garg A, Porgador A, Griffith DE, Klucar P, et al. (2005) Role of NK cell-activating receptors and their ligands in the lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium. *J Immunol* 175: 4611-4617.
532. Walch M, Dotiwala F, Mulik S, Thiery J, Kirchhausen T, et al. (2014) Cytotoxic cells kill intracellular bacteria through granulysin-mediated delivery of granzymes. *Cell* 157: 1309-1323.
533. Laskay T, Rollinghoff M, Solbach W (1993) Natural killer cells participate in the early defense against Leishmania major infection in mice. *Eur J Immunol* 23: 2237-2241.

534. Schariton TM, Scott P (1993) Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *J Exp Med* 178: 567-577.
535. Laskay T, Diefenbach A, Rollinghoff M, Solbach W (1995) Early parasite containment is decisive for resistance to *Leishmania major* infection. *Eur J Immunol* 25: 2220-2227.
536. Schariton-Kersten T, Scott P (1995) The role of the innate immune response in Th1 cell development following *Leishmania major* infection. *J Leukoc Biol* 57: 515-522.
537. Artavanis-Tsakonas K, Riley EM (2002) Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Immunol* 169: 2956-2963.
538. Artavanis-Tsakonas K, Eleme K, McQueen KL, Cheng NW, Parham P, et al. (2003) Activation of a subset of human NK cells upon contact with *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Immunol* 171: 5396-5405.
539. Baratin M, Roetynck S, Lepolard C, Falk C, Sawadogo S, et al. (2005) Natural killer cell and macrophage cooperation in MyD88-dependent innate responses to *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 14747-14752.
540. Korbel DS, Newman KC, Almeida CR, Davis DM, Riley EM (2005) Heterogeneous human NK cell responses to *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Immunol* 175: 7466-7473.
541. Chen Q, Amaladoss A, Ye W, Liu M, Dummler S, et al. (2014) Human natural killer cells control *Plasmodium falciparum* infection by eliminating infected red blood cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 1479-1484.
542. Schmidt S, Zimmermann SY, Tramsen L, Koehl U, Lehrnbecher T (2013) Natural killer cells and antifungal host response. *Clin Vaccine Immunol* 20: 452-458.
543. Schmidt S, Tramsen L, Hanisch M, Latge JP, Huenecke S, et al. (2011) Human natural killer cells exhibit direct activity against *Aspergillus fumigatus* hyphae, but not against resting conidia. *J Infect Dis* 203: 430-435.
544. Park SJ, Hughes MA, Burdick M, Strieter RM, Mehrad B (2009) Early NK cell-derived IFN- γ is essential to host defense in neutropenic invasive aspergillosis. *J Immunol* 182: 4306-4312.
545. Bouzani M, Ok M, McCormick A, Ebel F, Kurzai O, et al. (2011) Human NK cells display important antifungal activity against *Aspergillus fumigatus*, which is directly mediated by IFN-gamma release. *J Immunol* 187: 1369-1376.
546. Hume DA (2000) Probability in transcriptional regulation and its implications for leukocyte differentiation and inducible gene expression. *Blood* 96: 2323-2328.
547. Rogers TL, Holen I (2011) Tumour macrophages as potential targets of bisphosphonates. *J Transl Med* 9: 177.
548. Stanley ER (2009) Lineage commitment: cytokines instruct, at last! *Cell Stem Cell* 5: 234-236.
549. Pollard JW (2009) Trophic macrophages in development and disease. *Nat Rev Immunol* 9: 259-270.
550. Ziegler-Heitbrock L (2007) The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol* 81: 584-592.
551. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, et al. (2010) Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116: e74-80.
552. Geissmann F, Jung S, Littman DR (2003) Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19: 71-82.
553. Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, et al. (2007) Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 317: 666-670.

554. Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang SY, et al. (2010) Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 33: 375-386.
555. Gordon S, Crocker PR, Morris L, Lee SH, Perry VH, et al. (1986) Localization and function of tissue macrophages. *Ciba Found Symp* 118: 54-67.
556. Klein I, Cornejo JC, Polakos NK, John B, Wuensch SA, et al. (2007) Kupffer cell heterogeneity: functional properties of bone marrow derived and sessile hepatic macrophages. *Blood* 110: 4077-4085.
557. Wong CH, Jenne CN, Petri B, Chrobok NL, Kubes P (2013) Nucleation of platelets with blood-borne pathogens on Kupffer cells precedes other innate immunity and contributes to bacterial clearance. *Nat Immunol* 14: 785-792.
558. Gow DJ, Sester DP, Hume DA (2010) CSF-1, IGF-1, and the control of postnatal growth and development. *J Leukoc Biol* 88: 475-481.
559. Czerwielewski JM, Demarchez M (1987) Further evidence for the self-reproducing capacity of Langerhans cells in human skin. *J Invest Dermatol* 88: 17-20.
560. Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM (2007) Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci* 10: 1538-1543.
561. Jenkins SJ, Ruckerl D, Cook PC, Jones LH, Finkelman FD, et al. (2011) Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science* 332: 1284-1288.
562. Jenkins SJ, Ruckerl D, Thomas GD, Hewitson JP, Duncan S, et al. (2013) IL-4 directly signals tissue-resident macrophages to proliferate beyond homeostatic levels controlled by CSF-1. *J Exp Med* 210: 2477-2491.
563. Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, et al. (2013) Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* 38: 792-804.
564. Landsman L, Varol C, Jung S (2007) Distinct differentiation potential of blood monocyte subsets in the lung. *J Immunol* 178: 2000-2007.
565. Murray PJ, Wynn TA (2011) Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 11: 723-737.
566. Gordon S (2003) Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3: 23-35.
567. Mantovani A, Sica A, Locati M (2005) Macrophage polarization comes of age. *Immunity* 23: 344-346.
568. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75: 163-189.
569. Benoit M, Desnues B, Mege JL (2008) Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol* 181: 3733-3739.
570. Qian BZ, Pollard JW (2010) Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141: 39-51.
571. Biswas SK, Mantovani A (2010) Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* 11: 889-896.
572. Mosser DM, Edwards JP (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8: 958-969.
573. Sacconi A, Schioppa T, Porta C, Biswas SK, Nebuloni M, et al. (2006) p50 nuclear factor-kappaB overexpression in tumor-associated macrophages inhibits M1 inflammatory responses and antitumor resistance. *Cancer Res* 66: 11432-11440.
574. El Costa H, Quillay H, Marlin R, Cannou C, Duriez M, et al. (2016) The local environment orchestrates mucosal decidual macrophage differentiation and substantially inhibits HIV-1 replication. *Mucosal Immunol* 9: 634-646.

575. Soehnlein O, Lindbom L (2010) Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 10: 427-439.
576. Kawai T, Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11: 373-384.
577. Renkawitz J, Schumann K, Weber M, Lammermann T, Pflücke H, et al. (2009) Adaptive force transmission in amoeboid cell migration. *Nat Cell Biol* 11: 1438-1443.
578. Wynn TA (2008) Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 214: 199-210.
579. Garcia-Garcia E, Rosales C (2002) Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol* 72: 1092-1108.
580. Silva MT (2010) When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. *J Leukoc Biol* 87: 93-106.
581. Soehnlein O, Weber C, Lindbom L (2009) Neutrophil granule proteins tune monocytic cell function. *Trends Immunol* 30: 538-546.
582. Serhan CN (2007) Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu Rev Immunol* 25: 101-137.
583. Serhan CN, Savill J (2005) Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol* 6: 1191-1197.
584. Levy BD, Clish CB, Schmidt B, Gronert K, Serhan CN (2001) Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat Immunol* 2: 612-619.
585. Anderson G, Moore NC, Owen JJ, Jenkinson EJ (1996) Cellular interactions in thymocyte development. *Annu Rev Immunol* 14: 73-99.
586. Carlyle JR, Zuniga-Pflucker JC (1998) Requirement for the thymus in alphabeta T lymphocyte lineage commitment. *Immunity* 9: 187-197.
587. Germain RN (2002) T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* 2: 309-322.
588. Surh CD, Sprent J (1994) T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 372: 100-103.
589. Shortman K, Wu L (1996) Early T lymphocyte progenitors. *Annu Rev Immunol* 14: 29-47.
590. Shortman K, Egerton M, Spangrude GJ, Scollay R (1990) The generation and fate of thymocytes. *Semin Immunol* 2: 3-12.
591. Jameson SC (2002) Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2: 547-556.
592. Heath WR, Carbone FR (2001) Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 19: 47-64.
593. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC (2003) Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21: 685-711.
594. Thiault N, Darrigues J, Adoue V, Gros M, Binet B, et al. (2015) Peripheral regulatory T lymphocytes recirculating to the thymus suppress the development of their precursors. *Nat Immunol* 16: 628-634.
595. Bajenoff M, Granjeaud S, Guerder S (2003) The strategy of T cell antigen-presenting cell encounter in antigen-draining lymph nodes revealed by imaging of initial T cell activation. *J Exp Med* 198: 715-724.
596. Norbury CC, Malide D, Gibbs JS, Bennink JR, Yewdell JW (2002) Visualizing priming of virus-specific CD8+ T cells by infected dendritic cells in vivo. *Nat Immunol* 3: 265-271.
597. Schaefer BC, Schaefer ML, Kappler JW, Marrack P, Kiedl RM (2001) Observation of antigen-dependent CD8+ T-cell/ dendritic cell interactions in vivo. *Cell Immunol* 214: 110-122.

598. Banchereau J, Steinman RM (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245-252.
599. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH (2005) The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 23: 515-548.
600. Mescher MF, Curtsinger JM, Agarwal P, Casey KA, Gerner M, et al. (2006) Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. *Immunol Rev* 211: 81-92.
601. Watts TH (2005) TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu Rev Immunol* 23: 23-68.
602. Curtsinger JM, Schmidt CS, Mondino A, Lins DC, Kedl RM, et al. (1999) Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* 162: 3256-3262.
603. Drake CG, Jaffee E, Pardoll DM (2006) Mechanisms of immune evasion by tumors. *Adv Immunol* 90: 51-81.
604. Kapsenberg ML (2003) Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 3: 984-993.
605. Li QJ, Dinner AR, Qi S, Irvine DJ, Huppa JB, et al. (2004) CD4 enhances T cell sensitivity to antigen by coordinating Lck accumulation at the immunological synapse. *Nat Immunol* 5: 791-799.
606. Holler PD, Kranz DM (2003) Quantitative analysis of the contribution of TCR/pepMHC affinity and CD8 to T cell activation. *Immunity* 18: 255-264.
607. Chen L, Flies DB (2013) Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* 13: 227-242.
608. Cebrian M, Yague E, Rincon M, Lopez-Botet M, de Landazuri MO, et al. (1988) Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes. *J Exp Med* 168: 1621-1637.
609. Caruso A, Licenziati S, Corulli M, Canaris AD, De Francesco MA, et al. (1997) Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. *Cytometry* 27: 71-76.
610. Scholzen T, Gerdes J (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182: 311-322.
611. Morra M, Zubiaur M, Terhorst C, Sancho J, Malavasi F (1998) CD38 is functionally dependent on the TCR/CD3 complex in human T cells. *FASEB J* 12: 581-592.
612. Saito T, Yokosuka T, Hashimoto-Tane A (2010) Dynamic regulation of T cell activation and co-stimulation through TCR-microclusters. *FEBS Lett* 584: 4865-4871.
613. Cai G, Anumanthan A, Brown JA, Greenfield EA, Zhu B, et al. (2008) CD160 inhibits activation of human CD4+ T cells through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nat Immunol* 9: 176-185.
614. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA (1996) CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 14: 233-258.
615. Sharpe AH, Freeman GJ (2002) The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2: 116-126.
616. Wherry EJ (2011) T cell exhaustion. *Nat Immunol* 12: 492-499.
617. Wherry EJ, Kurachi M (2015) Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol* 15: 486-499.
618. Zhu J, Yamane H, Paul WE (2010) Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol* 28: 445-489.
619. Lambrecht BN, Hammad H (2015) The immunology of asthma. *Nat Immunol* 16: 45-56.

620. Siffrin V, Radbruch H, Glumm R, Niesner R, Paterka M, et al. (2010) In vivo imaging of partially reversible th17 cell-induced neuronal dysfunction in the course of encephalomyelitis. *Immunity* 33: 424-436.
621. Crotty S (2014) T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity* 41: 529-542.
622. Kaplan MH, Hufford MM, Olson MR (2015) The development and in vivo function of T helper 9 cells. *Nat Rev Immunol* 15: 295-307.
623. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ (2009) Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 30: 626-635.
624. Boden EK, Lord JD (2017) CD4 T Cells in IBD: Crossing the Line? *Dig Dis Sci* 62: 2208-2210.
625. Kemp RA, Backstrom BT, Ronchese F (2005) The phenotype of type 1 and type 2 CD8+ T cells activated in vitro is affected by culture conditions and correlates with effector activity. *Immunology* 115: 315-324.
626. Gartlan KH, Markey KA, Varelias A, Bunting MD, Koyama M, et al. (2015) Tc17 cells are a proinflammatory, plastic lineage of pathogenic CD8+ T cells that induce GVHD without antileukemic effects. *Blood* 126: 1609-1620.
627. Churlaud G, Pitoiset F, Jebbawi F, Lorenzon R, Bellier B, et al. (2015) Human and Mouse CD8(+)CD25(+)FOXP3(+) Regulatory T Cells at Steady State and during Interleukin-2 Therapy. *Front Immunol* 6: 171.
628. Menager-Marcq I, Pomie C, Romagnoli P, van Meerwijk JP (2006) CD8+CD28-regulatory T lymphocytes prevent experimental inflammatory bowel disease in mice. *Gastroenterology* 131: 1775-1785.
629. Sun JC, Lanier LL (2011) NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8(+) T cells. *Nat Rev Immunol* 11: 645-657.
630. Arstila TP, Casrouge A, Baron V, Even J, Kanellopoulos J, et al. (1999) A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science* 286: 958-961.
631. Blattman JN, Antia R, Sourdiv DJ, Wang X, Kaech SM, et al. (2002) Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells. *J Exp Med* 195: 657-664.
632. Kedl RM, Mescher MF (1998) Qualitative differences between naive and memory T cells make a major contribution to the more rapid and efficient memory CD8+ T cell response. *J Immunol* 161: 674-683.
633. Kaech SM, Hemby S, Kersh E, Ahmed R (2002) Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell* 111: 837-851.
634. Badovinac VP, Porter BB, Harty JT (2002) Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nat Immunol* 3: 619-626.
635. Gett AV, Sallusto F, Lanzavecchia A, Geginat J (2003) T cell fitness determined by signal strength. *Nat Immunol* 4: 355-360.
636. Sarkar S, Kalia V, Haining WN, Konieczny BT, Subramaniam S, et al. (2008) Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates. *J Exp Med* 205: 625-640.
637. Veiga-Fernandes H, Walter U, Bourgeois C, McLean A, Rocha B (2000) Response of naive and memory CD8+ T cells to antigen stimulation in vivo. *Nat Immunol* 1: 47-53.
638. Gattinoni L, Klebanoff CA, Restifo NP (2012) Paths to stemness: building the ultimate antitumour T cell. *Nat Rev Cancer* 12: 671-684.
639. De Rosa SC, Herzenberg LA, Roederer M (2001) 11-color, 13-parameter flow cytometry: identification of human naive T cells by phenotype, function, and T-cell receptor diversity. *Nat Med* 7: 245-248.

640. Oberdoerffer S, Moita LF, Neems D, Freitas RP, Hacohen N, et al. (2008) Regulation of CD45 alternative splicing by heterogeneous ribonucleoprotein, hnRNPLL. *Science* 321: 686-691.
641. Wu Z, Jia X, de la Cruz L, Su XC, Marzolf B, et al. (2008) Memory T cell RNA rearrangement programmed by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein hnRNPLL. *Immunity* 29: 863-875.
642. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A (1999) Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401: 708-712.
643. Masopust D, Vezys V, Marzo AL, Lefrancois L (2001) Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* 291: 2413-2417.
644. Kambayashi T, Assarsson E, Lukacher AE, Ljunggren HG, Jensen PE (2003) Memory CD8+ T cells provide an early source of IFN-gamma. *J Immunol* 170: 2399-2408.
645. Newell EW, Sigal N, Bendall SC, Nolan GP, Davis MM (2012) Cytometry by time-of-flight shows combinatorial cytokine expression and virus-specific cell niches within a continuum of CD8+ T cell phenotypes. *Immunity* 36: 142-152.
646. Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, Pos Z, Paulos CM, et al. (2011) A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med* 17: 1290-1297.
647. Cui W, Kaech SM (2010) Generation of effector CD8+ T cells and their conversion to memory T cells. *Immunol Rev* 236: 151-166.
648. Goldrath AW, Sivakumar PV, Glaccum M, Kennedy MK, Bevan MJ, et al. (2002) Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8+ T cells. *J Exp Med* 195: 1515-1522.
649. Kieper WC, Tan JT, Bondi-Boyd B, Gapin L, Sprent J, et al. (2002) Overexpression of interleukin (IL)-7 leads to IL-15-independent generation of memory phenotype CD8+ T cells. *J Exp Med* 195: 1533-1539.
650. Erlebacher A (2013) Immunology of the maternal-fetal interface. *Annu Rev Immunol* 31: 387-411.
651. Vacca P, Montaldo E, Croxatto D, Loiacono F, Canegallo F, et al. (2015) Identification of diverse innate lymphoid cells in human decidua. *Mucosal Immunol* 8: 254-264.
652. Jabrane-Ferrat N, Siewiera J (2014) The up side of decidual natural killer cells: new developments in immunology of pregnancy. *Immunology* 141: 490-497.
653. El Costa H, Casemayou A, Aguerre-Girr M, Rabot M, Berrebi A, et al. (2008) Critical and differential roles of NKp46- and NKp30-activating receptors expressed by uterine NK cells in early pregnancy. *J Immunol* 181: 3009-3017.
654. Trundley A, Moffett A (2004) Human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue Antigens* 63: 1-12.
655. Hiby SE, King A, Sharkey AM, Loke YW (1997) Human uterine NK cells have a similar repertoire of killer inhibitory and activatory receptors to those found in blood, as demonstrated by RT-PCR and sequencing. *Mol Immunol* 34: 419-430.
656. El Costa H, Tabiasco J, Berrebi A, Parant O, Aguerre-Girr M, et al. (2009) Effector functions of human decidual NK cells in healthy early pregnancy are dependent on the specific engagement of natural cytotoxicity receptors. *J Reprod Immunol* 82: 142-147.
657. Koopman LA, Kopcow HD, Rybalov B, Boyson JE, Orange JS, et al. (2003) Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med* 198: 1201-1212.
658. Keskin DB, Allan DS, Rybalov B, Andzelm MM, Stern JN, et al. (2007) TGFbeta promotes conversion of CD16+ peripheral blood NK cells into CD16- NK cells with similarities to decidual NK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 3378-3383.

659. Hanna J, Wald O, Goldman-Wohl D, Prus D, Markel G, et al. (2003) CXCL12 expression by invasive trophoblasts induces the specific migration of CD16- human natural killer cells. *Blood* 102: 1569-1577.
660. Gamliel M, Goldman-Wohl D, Isaacson B, Gur C, Stein N, et al. (2018) Trained Memory of Human Uterine NK Cells Enhances Their Function in Subsequent Pregnancies. *Immunity* 48: 951-962 e955.
661. Le Bouteiller P, Tabiasco J (2006) Killers become builders during pregnancy. *Nat Med* 12: 991-992.
662. Lash GE, Schiessl B, Kirkley M, Innes BA, Cooper A, et al. (2006) Expression of angiogenic growth factors by uterine natural killer cells during early pregnancy. *J Leukoc Biol* 80: 572-580.
663. Dimmeler S, Rippmann V, Weiland U, Haendeler J, Zeiher AM (1997) Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide. *Circ Res* 81: 970-976.
664. Witzensbichler B, Asahara T, Murohara T, Silver M, Spyridopoulos I, et al. (1998) Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C/VEGF-2) promotes angiogenesis in the setting of tissue ischemia. *Am J Pathol* 153: 381-394.
665. Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Avraham I, Greenfield C, et al. (2006) Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med* 12: 1065-1074.
666. Naruse K, Lash GE, Innes BA, Otun HA, Searle RF, et al. (2009) Localization of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9 and tissue inhibitors for MMPs (TIMPs) in uterine natural killer cells in early human pregnancy. *Hum Reprod* 24: 553-561.
667. Hu Y, Dutz JP, MacCalman CD, Yong P, Tan R, et al. (2006) Decidual NK cells alter in vitro first trimester extravillous cytotrophoblast migration: a role for IFN-gamma. *J Immunol* 177: 8522-8530.
668. Fu B, Zhou Y, Ni X, Tong X, Xu X, et al. (2017) Natural Killer Cells Promote Fetal Development through the Secretion of Growth-Promoting Factors. *Immunity* 47: 1100-1113 e1106.
669. Quillay H, El Costa H, Duriez M, Marlin R, Cannou C, et al. (2016) NK cells control HIV-1 infection of macrophages through soluble factors and cellular contacts in the human decidua. *Retrovirology* 13: 39.
670. Wallace AE, Fraser R, Cartwright JE (2012) Extravillous trophoblast and decidual natural killer cells: a remodelling partnership. *Hum Reprod Update* 18: 458-471.
671. Li C, Houser BL, Nicotra ML, Strominger JL (2009) HLA-G homodimer-induced cytokine secretion through HLA-G receptors on human decidual macrophages and natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 5767-5772.
672. Rajagopalan S, Bryceson YT, Kuppusamy SP, Geraghty DE, van der Meer A, et al. (2006) Activation of NK cells by an endocytosed receptor for soluble HLA-G. *PLoS Biol* 4: e9.
673. Chakraborty D, Rumi MA, Konno T, Soares MJ (2011) Natural killer cells direct hemochorial placentation by regulating hypoxia-inducible factor dependent trophoblast lineage decisions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 16295-16300.
674. De Oliveira LG, Lash GE, Murray-Dunning C, Bulmer JN, Innes BA, et al. (2010) Role of interleukin 8 in uterine natural killer cell regulation of extravillous trophoblast cell invasion. *Placenta* 31: 595-601.
675. Jovanovic M, Stefanoska I, Radojicic L, Vicovac L (2010) Interleukin-8 (CXCL8) stimulates trophoblast cell migration and invasion by increasing levels of matrix metalloproteinase (MMP)2 and MMP9 and integrins alpha5 and beta1. *Reproduction* 139: 789-798.

676. King A, Allan DS, Bowen M, Powis SJ, Joseph S, et al. (2000) HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells. *Eur J Immunol* 30: 1623-1631.
677. Hiby SE, Walker JJ, O'Shaughnessy K M, Redman CW, Carrington M, et al. (2004) Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med* 200: 957-965.
678. Hiby SE, Apps R, Sharkey AM, Farrell LE, Gardner L, et al. (2010) Maternal activating KIRs protect against human reproductive failure mediated by fetal HLA-C2. *J Clin Invest* 120: 4102-4110.
679. Kieckbusch J, Gaynor LM, Moffett A, Colucci F (2014) MHC-dependent inhibition of uterine NK cells impedes fetal growth and decidual vascular remodelling. *Nat Commun* 5: 3359.
680. Kopcow HD, Allan DS, Chen X, Rybalov B, Andzelm MM, et al. (2005) Human decidual NK cells form immature activating synapses and are not cytotoxic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 15563-15568.
681. Kalkunte S, Chichester CO, Gotsch F, Sentman CL, Romero R, et al. (2008) Evolution of non-cytotoxic uterine natural killer cells. *Am J Reprod Immunol* 59: 425-432.
682. Vacca P, Pietra G, Falco M, Romeo E, Bottino C, et al. (2006) Analysis of natural killer cells isolated from human decidua: Evidence that 2B4 (CD244) functions as an inhibitory receptor and blocks NK-cell function. *Blood* 108: 4078-4085.
683. Hirst CE, Buzza MS, Sutton VR, Trapani JA, Loveland KL, et al. (2001) Perforin-independent expression of granzyme B and proteinase inhibitor 9 in human testis and placenta suggests a role for granzyme B-mediated proteolysis in reproduction. *Mol Hum Reprod* 7: 1133-1142.
684. Straszewski-Chavez SL, Abrahams VM, Funai EF, Mor G (2004) X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) confers human trophoblast cell resistance to Fas-mediated apoptosis. *Mol Hum Reprod* 10: 33-41.
685. Siewiera J, El Costa H, Tabiasco J, Berrebi A, Cartron G, et al. (2013) Human cytomegalovirus infection elicits new decidual natural killer cell effector functions. *PLoS Pathog* 9: e1003257.
686. Crespo AC, Strominger JL, Tilburgs T (2016) Expression of KIR2DS1 by decidual natural killer cells increases their ability to control placental HCMV infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: 15072-15077.
687. Nachmani D, Zimmermann A, Oiknine Djian E, Weisblum Y, Livneh Y, et al. (2014) MicroRNA editing facilitates immune elimination of HCMV infected cells. *PLoS Pathog* 10: e1003963.
688. Brighton PJ, Maruyama Y, Fishwick K, Vrljicak P, Tewary S, et al. (2017) Clearance of senescent decidual cells by uterine natural killer cells in cycling human endometrium. *Elife* 6.
689. Kopcow HD, Eriksson M, Mselle TF, Damrauer SM, Wira CR, et al. (2010) Human decidual NK cells from gravid uteri and NK cells from cycling endometrium are distinct NK cell subsets. *Placenta* 31: 334-338.
690. Manaster I, Mizrahi S, Goldman-Wohl D, Sela HY, Stern-Ginossar N, et al. (2008) Endometrial NK cells are special immature cells that await pregnancy. *J Immunol* 181: 1869-1876.
691. Okada S, Okada H, Sanezumi M, Nakajima T, Yasuda K, et al. (2000) Expression of interleukin-15 in human endometrium and decidua. *Mol Hum Reprod* 6: 75-80.
692. Vacca P, Vitale C, Montaldo E, Conte R, Cantoni C, et al. (2011) CD34+ hematopoietic precursors are present in human decidua and differentiate into natural killer cells upon interaction with stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 2402-2407.

693. Hannan NJ, Jones RL, Critchley HO, Kovacs GJ, Rogers PA, et al. (2004) Coexpression of fractalkine and its receptor in normal human endometrium and in endometrium from users of progestin-only contraception supports a role for fractalkine in leukocyte recruitment and endometrial remodeling. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 6119-6129.
694. Kitaya K, Nakayama T, Daikoku N, Fushiki S, Honjo H (2004) Spatial and temporal expression of ligands for CXCR3 and CXCR4 in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2470-2476.
695. Kitaya K, Nakayama T, Okubo T, Kuroboshi H, Fushiki S, et al. (2003) Expression of macrophage inflammatory protein-1beta in human endometrium: its role in endometrial recruitment of natural killer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 1809-1814.
696. Carlino C, Stabile H, Morrone S, Bulla R, Soriani A, et al. (2008) Recruitment of circulating NK cells through decidual tissues: a possible mechanism controlling NK cell accumulation in the uterus during early pregnancy. *Blood* 111: 3108-3115.
697. Jones RL, Hannan NJ, Kaitu'u TJ, Zhang J, Salamonsen LA (2004) Identification of chemokines important for leukocyte recruitment to the human endometrium at the times of embryo implantation and menstruation. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 6155-6167.
698. Wu X, Jin LP, Yuan MM, Zhu Y, Wang MY, et al. (2005) Human first-trimester trophoblast cells recruit CD56brightCD16- NK cells into decidua by way of expressing and secreting of CXCL12/stromal cell-derived factor 1. *J Immunol* 175: 61-68.
699. Drake PM, Gunn MD, Charo IF, Tsou CL, Zhou Y, et al. (2001) Human placental cytotrophoblasts attract monocytes and CD56(bright) natural killer cells via the actions of monocyte inflammatory protein 1alpha. *J Exp Med* 193: 1199-1212.
700. Frey M, Packianathan NB, Fehniger TA, Ross ME, Wang WC, et al. (1998) Differential expression and function of L-selectin on CD56bright and CD56dim natural killer cell subsets. *J Immunol* 161: 400-408.
701. Yamaguchi T, Kitaya K, Daikoku N, Yasuo T, Fushiki S, et al. (2006) Potential selectin L ligands involved in selective recruitment of peripheral blood CD16(-) natural killer cells into human endometrium. *Biol Reprod* 74: 35-40.
702. Acar N, Ustunel I, Demir R (2010) Uterine natural killer (uNK) cells and their missions during pregnancy: a review. *Acta Histochem* 113: 82-91.
703. Sharkey AM, Xiong S, Kennedy PR, Gardner L, Farrell LE, et al. (2015) Tissue-Specific Education of Decidual NK Cells. *J Immunol* 195: 3026-3032.
704. Williams PJ, Searle RF, Robson SC, Innes BA, Bulmer JN (2009) Decidual leucocyte populations in early to late gestation normal human pregnancy. *J Reprod Immunol* 82: 24-31.
705. Gustafsson C, Mjosberg J, Matussek A, Geffers R, Matthiesen L, et al. (2008) Gene expression profiling of human decidual macrophages: evidence for immunosuppressive phenotype. *PLoS One* 3: e2078.
706. Kammerer U, Eggert AO, Kapp M, McLellan AD, Geijtenbeek TB, et al. (2003) Unique appearance of proliferating antigen-presenting cells expressing DC-SIGN (CD209) in the decidua of early human pregnancy. *Am J Pathol* 162: 887-896.
707. Repnik U, Tilburgs T, Roelen DL, van der Mast BJ, Kanhai HH, et al. (2008) Comparison of macrophage phenotype between decidua basalis and decidua parietalis by flow cytometry. *Placenta* 29: 405-412.
708. Svensson J, Jenmalm MC, Matussek A, Geffers R, Berg G, et al. (2011) Macrophages at the fetal-maternal interface express markers of alternative activation and are induced by M-CSF and IL-10. *J Immunol* 187: 3671-3682.
709. Heikkinen J, Mottonen M, Komi J, Alanen A, Lassila O (2003) Phenotypic characterization of human decidual macrophages. *Clin Exp Immunol* 131: 498-505.

710. Marlin R, Nugeyre MT, de Truchis C, Berkane N, Gervaise A, et al. (2009) Antigen-presenting cells represent targets for R5 HIV-1 infection in the first trimester pregnancy uterine mucosa. *PLoS One* 4: e5971.
711. Lidstrom C, Matthiesen L, Berg G, Sharma S, Ernerudh J, et al. (2003) Cytokine secretion patterns of NK cells and macrophages in early human pregnancy decidua and blood: implications for suppressor macrophages in decidua. *Am J Reprod Immunol* 50: 444-452.
712. Engert S, Rieger L, Kapp M, Becker JC, Dietl J, et al. (2007) Profiling chemokines, cytokines and growth factors in human early pregnancy decidua by protein array. *Am J Reprod Immunol* 58: 129-137.
713. Houser BL, Tilburgs T, Hill J, Nicotra ML, Strominger JL (2011) Two unique human decidual macrophage populations. *J Immunol* 186: 2633-2642.
714. Hazan AD, Smith SD, Jones RL, Whittle W, Lye SJ, et al. (2010) Vascular-leukocyte interactions: mechanisms of human decidual spiral artery remodeling in vitro. *Am J Pathol* 177: 1017-1030.
715. Smith SD, Dunk CE, Aplin JD, Harris LK, Jones RL (2009) Evidence for immune cell involvement in decidual spiral arteriole remodeling in early human pregnancy. *Am J Pathol* 174: 1959-1971.
716. Mor G, Abrahams VM (2003) Potential role of macrophages as immunoregulators of pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol* 1: 119.
717. Singh U, Nicholson G, Urban BC, Sargent IL, Kishore U, et al. (2005) Immunological properties of human decidual macrophages--a possible role in intrauterine immunity. *Reproduction* 129: 631-637.
718. Munoz-Suano A, Hamilton AB, Betz AG (2011) Gimme shelter: the immune system during pregnancy. *Immunol Rev* 241: 20-38.
719. Mjosberg J, Berg G, Jenmalm MC, Ernerudh J (2010) FOXP3+ regulatory T cells and T helper 1, T helper 2, and T helper 17 cells in human early pregnancy decidua. *Biol Reprod* 82: 698-705.
720. Nancy P, Tagliani E, Tay CS, Asp P, Levy DE, et al. (2012) Chemokine gene silencing in decidual stromal cells limits T cell access to the maternal-fetal interface. *Science* 336: 1317-1321.
721. Nancy P, Siewiera J, Rizzuto G, Tagliani E, Osokine I, et al. (2018) H3K27me3 dynamics dictate evolving uterine states in pregnancy and parturition. *J Clin Invest* 128: 233-247.
722. Arck PC, Hecher K (2013) Fetomaternal immune cross-talk and its consequences for maternal and offspring's health. *Nat Med* 19: 548-556.
723. Collins MK, Tay CS, Erlebacher A (2009) Dendritic cell entrapment within the pregnant uterus inhibits immune surveillance of the maternal/fetal interface in mice. *J Clin Invest* 119: 2062-2073.
724. Bockle BC, Solder E, Kind S, Romani N, Sepp NT (2008) DC-sign+ CD163+ macrophages expressing hyaluronan receptor LYVE-1 are located within chorion villi of the placenta. *Placenta* 29: 187-192.
725. Erlebacher A, Vencato D, Price KA, Zhang D, Glimcher LH (2007) Constraints in antigen presentation severely restrict T cell recognition of the allogeneic fetus. *J Clin Invest* 117: 1399-1411.
726. Nagamatsu T, Schust DJ, Sugimoto J, Barrier BF (2009) Human decidual stromal cells suppress cytokine secretion by allogenic CD4+ T cells via PD-1 ligand interactions. *Hum Reprod* 24: 3160-3171.
727. Runic R, Lockwood CJ, Ma Y, Dipasquale B, Guller S (1996) Expression of Fas ligand by human cytotrophoblasts: implications in placentation and fetal survival. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 3119-3122.

728. Blois SM, Ilarregui JM, Tometten M, Garcia M, Orsal AS, et al. (2007) A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. *Nat Med* 13: 1450-1457.
729. Kopcow HD, Rosetti F, Leung Y, Allan DS, Kutok JL, et al. (2008) T cell apoptosis at the maternal-fetal interface in early human pregnancy, involvement of galectin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 18472-18477.
730. von Rango U, Krusche CA, Beier HM, Classen-Linke I (2007) Indoleamine-dioxygenase is expressed in human decidua at the time maternal tolerance is established. *J Reprod Immunol* 74: 34-45.
731. Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, et al. (1998) Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 281: 1191-1193.
732. Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, et al. (1999) Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med* 189: 1363-1372.
733. Harden JL, Egilmez NK (2012) Indoleamine 2,3-dioxygenase and dendritic cell tolerogenicity. *Immunol Invest* 41: 738-764.
734. Fu B, Li X, Sun R, Tong X, Ling B, et al. (2013) Natural killer cells promote immune tolerance by regulating inflammatory TH17 cells at the human maternal-fetal interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: E231-240.
735. Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG (2004) Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol* 5: 266-271.
736. Tilburgs T, Roelen DL, van der Mast BJ, de Groot-Swings GM, Kleijburg C, et al. (2008) Evidence for a selective migration of fetus-specific CD4⁺CD25^{bright} regulatory T cells from the peripheral blood to the decidua in human pregnancy. *J Immunol* 180: 5737-5745.
737. Vacca P, Cantoni C, Vitale M, Prato C, Canegallo F, et al. (2010) Crosstalk between decidual NK and CD14⁺ myelomonocytic cells results in induction of Tregs and immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 11918-11923.
738. Tilburgs T, Crespo AC, van der Zwan A, Rybalov B, Raj T, et al. (2015) Human HLA-G⁺ extravillous trophoblasts: Immune-activating cells that interact with decidual leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 7219-7224.
739. Samstein RM, Josefowicz SZ, Arvey A, Treuting PM, Rudensky AY (2012) Extrathymic generation of regulatory T cells in placental mammals mitigates maternal-fetal conflict. *Cell* 150: 29-38.
740. Tilburgs T, Roelen DL, van der Mast BJ, van Schip JJ, Kleijburg C, et al. (2006) Differential distribution of CD4⁽⁺⁾CD25^(bright) and CD8⁽⁺⁾CD28⁽⁻⁾ T-cells in decidua and maternal blood during human pregnancy. *Placenta* 27 Suppl A: S47-53.
741. Huang B, Faucette AN, Pawlitz MD, Pei B, Goyert JW, et al. (2017) Interleukin-33-induced expression of PIBF1 by decidual B cells protects against preterm labor. *Nat Med* 23: 128-135.
742. Medina KL, Smithson G, Kincade PW (1993) Suppression of B lymphopoiesis during normal pregnancy. *J Exp Med* 178: 1507-1515.
743. Holmes CH, Simpson KL, Okada H, Okada N, Wainwright SD, et al. (1992) Complement regulatory proteins at the feto-maternal interface during human placental development: distribution of CD59 by comparison with membrane cofactor protein (CD46) and decay accelerating factor (CD55). *Eur J Immunol* 22: 1579-1585.
744. Xu C, Mao D, Holers VM, Palanca B, Cheng AM, et al. (2000) A critical role for murine complement regulator *crry* in fetomaternal tolerance. *Science* 287: 498-501.
745. Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, Ketiladze ES, Braginsky DM, et al. (1983) Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirol* 20: 23-31.

746. Huang CC, Nguyen D, Fernandez J, Yun KY, Fry KE, et al. (1992) Molecular cloning and sequencing of the Mexico isolate of hepatitis E virus (HEV). *Virology* 191: 550-558.
747. Reyes GR, Purdy MA, Kim JP, Luk KC, Young LM, et al. (1990) Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* 247: 1335-1339.
748. Tam AW, Smith MM, Guerra ME, Huang CC, Bradley DW, et al. (1991) Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* 185: 120-131.
749. Kamar N, Izopet J, Pavio N, Aggarwal R, Labrique A, et al. (2017) Hepatitis E virus infection. *Nat Rev Dis Primers* 3: 17086.
750. Smith DB, Simmonds P, Jameel S, Emerson SU, Harrison TJ, et al. (2014) Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *J Gen Virol* 95: 2223-2232.
751. Lhomme S, Marion O, Abravanel F, Chapuy-Regaud S, Kamar N, et al. (2016) Hepatitis E Pathogenesis. *Viruses* 8.
752. Smith DB, Simmonds P, Izopet J, Oliveira-Filho EF, Ulrich RG, et al. (2016) Proposed reference sequences for hepatitis E virus subtypes. *J Gen Virol* 97: 537-542.
753. Agarwal S, Baccam P, Aggarwal R, Veerapu NS (2018) Novel Synthesis and Phenotypic Analysis of Mutant Clouds for Hepatitis E Virus Genotype 1. *J Virol* 92.
754. Lhomme S, Abravanel F, Dubois M, Sandres-Saune K, Rostaing L, et al. (2012) Hepatitis E virus quasispecies and the outcome of acute hepatitis E in solid-organ transplant patients. *J Virol* 86: 10006-10014.
755. Kamar N, Bendall R, Legrand-Abravanel F, Xia NS, Ijaz S, et al. (2012) Hepatitis E. *Lancet* 379: 2477-2488.
756. Aggarwal R, Naik SR (1992) Faecal excretion of hepatitis E virus. *Lancet* 340: 787.
757. Ippagunta SK, Naik S, Sharma B, Aggarwal R (2007) Presence of hepatitis E virus in sewage in Northern India: frequency and seasonal pattern. *J Med Virol* 79: 1827-1831.
758. Mansuy JM, Gallian P, Dimeglio C, Saune K, Arnaud C, et al. (2016) A nationwide survey of hepatitis E viral infection in French blood donors. *Hepatology* 63: 1145-1154.
759. Mansuy JM, Bendall R, Legrand-Abravanel F, Saune K, Miedouge M, et al. (2011) Hepatitis E virus antibodies in blood donors, France. *Emerg Infect Dis* 17: 2309-2312.
760. Meng XJ (2013) Zoonotic and foodborne transmission of hepatitis E virus. *Semin Liver Dis* 33: 41-49.
761. Pavio N, Meng XJ, Renou C (2010) Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. *Vet Res* 41: 46.
762. Colson P, Borentain P, Queyriaux B, Kaba M, Moal V, et al. (2010) Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J Infect Dis* 202: 825-834.
763. Li TC, Chijiwa K, Sera N, Ishibashi T, Etoh Y, et al. (2005) Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg Infect Dis* 11: 1958-1960.
764. Tei S, Kitajima N, Ohara S, Inoue Y, Miki M, et al. (2004) Consumption of uncooked deer meat as a risk factor for hepatitis E virus infection: an age- and sex-matched case-control study. *J Med Virol* 74: 67-70.
765. Bouwknegt M, Engel B, Herremans MM, Widdowson MA, Worm HC, et al. (2008) Bayesian estimation of hepatitis E virus seroprevalence for populations with different exposure levels to swine in The Netherlands. *Epidemiol Infect* 136: 567-576.
766. Chaussade H, Rigaud E, Allix A, Carpentier A, Touze A, et al. (2013) Hepatitis E virus seroprevalence and risk factors for individuals in working contact with animals. *J Clin Virol* 58: 504-508.

767. Lee GH, Tan BH, Teo EC, Lim SG, Dan YY, et al. (2016) Chronic Infection With Camelid Hepatitis E Virus in a Liver Transplant Recipient Who Regularly Consumes Camel Meat and Milk. *Gastroenterology* 150: 355-357 e353.
768. Khuroo MS, Kamili S, Yattoo GN (2004) Hepatitis E virus infection may be transmitted through blood transfusions in an endemic area. *J Gastroenterol Hepatol* 19: 778-784.
769. Hauser L, Roque-Afonso AM, Beylouné A, Simonet M, Deau Fischer B, et al. (2014) Hepatitis E transmission by transfusion of Intercept blood system-treated plasma. *Blood* 123: 796-797.
770. Hewitt PE, Ijaz S, Brailsford SR, Brett R, Dicks S, et al. (2014) Hepatitis E virus in blood components: a prevalence and transmission study in southeast England. *Lancet* 384: 1766-1773.
771. Juhl D, Baylis SA, Blumel J, Gorg S, Hennig H (2014) Seroprevalence and incidence of hepatitis E virus infection in German blood donors. *Transfusion* 54: 49-56.
772. Gallian P, Couchouron A, Dupont I, Fabra C, Piquet Y, et al. (2017) Comparison of hepatitis E virus nucleic acid test screening platforms and RNA prevalence in French blood donors. *Transfusion* 57: 223-224.
773. Schlosser B, Stein A, Neuhaus R, Pahl S, Ramez B, et al. (2012) Liver transplant from a donor with occult HEV infection induced chronic hepatitis and cirrhosis in the recipient. *J Hepatol* 56: 500-502.
774. Pourbaix A, Ouali N, Soussan P, Roque Afonso AM, Peraldi MN, et al. (2017) Evidence of hepatitis E virus transmission by renal graft. *Transpl Infect Dis* 19.
775. Koenecke C, Pischke S, Beutel G, Ritter U, Ganser A, et al. (2014) Hepatitis E virus infection in a hematopoietic stem cell donor. *Bone Marrow Transplant* 49: 159-160.
776. Koonin EV, Gorbalenya AE, Purdy MA, Rozanov MN, Reyes GR, et al. (1992) Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 8259-8263.
777. Emerson SU, Zhang M, Meng XJ, Nguyen H, St Claire M, et al. (2001) Recombinant hepatitis E virus genomes infectious for primates: importance of capping and discovery of a cis-reactive element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 15270-15275.
778. Zhang M, Purcell RH, Emerson SU (2001) Identification of the 5' terminal sequence of the SAR-55 and MEX-14 strains of hepatitis E virus and confirmation that the genome is capped. *J Med Virol* 65: 293-295.
779. Karpe YA, Lole KS (2011) Deubiquitination activity associated with hepatitis E virus putative papain-like cysteine protease. *J Gen Virol* 92: 2088-2092.
780. Lhomme S, Abravanel F, Dubois M, Chapuy-Regaud S, Sandres-Saune K, et al. (2015) Temporal evolution of the distribution of hepatitis E virus genotypes in Southwestern France. *Infect Genet Evol* 35: 50-55.
781. Pudupakam RS, Huang YW, Opriessnig T, Halbur PG, Pierson FW, et al. (2009) Deletions of the hypervariable region (HVR) in open reading frame 1 of hepatitis E virus do not abolish virus infectivity: evidence for attenuation of HVR deletion mutants in vivo. *J Virol* 83: 384-395.
782. Smith DB, Purdy MA, Simmonds P (2013) Genetic variability and the classification of hepatitis E virus. *J Virol* 87: 4161-4169.
783. Pudupakam RS, Kenney SP, Cordoba L, Huang YW, Dryman BA, et al. (2011) Mutational analysis of the hypervariable region of hepatitis e virus reveals its involvement in the efficiency of viral RNA replication. *J Virol* 85: 10031-10040.
784. Nan Y, Yu Y, Ma Z, Khatrar SK, Fredericksen B, et al. (2014) Hepatitis E virus inhibits type I interferon induction by ORF1 products. *J Virol* 88: 11924-11932.

785. Anang S, Subramani C, Nair VP, Kaul S, Kaushik N, et al. (2016) Identification of critical residues in Hepatitis E virus macro domain involved in its interaction with viral methyltransferase and ORF3 proteins. *Sci Rep* 6: 25133.
786. Kadare G, Haenni AL (1997) Virus-encoded RNA helicases. *J Virol* 71: 2583-2590.
787. Karpe YA, Lole KS (2010) RNA 5'-triphosphatase activity of the hepatitis E virus helicase domain. *J Virol* 84: 9637-9641.
788. O'Reilly EK, Kao CC (1998) Analysis of RNA-dependent RNA polymerase structure and function as guided by known polymerase structures and computer predictions of secondary structure. *Virology* 252: 287-303.
789. Rehman S, Kapur N, Durgapal H, Panda SK (2008) Subcellular localization of hepatitis E virus (HEV) replicase. *Virology* 370: 77-92.
790. Li TC, Yamakawa Y, Suzuki K, Tatsumi M, Razak MA, et al. (1997) Expression and self-assembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J Virol* 71: 7207-7213.
791. Xing L, Wang JC, Li TC, Yasutomi Y, Lara J, et al. (2011) Spatial configuration of hepatitis E virus antigenic domain. *J Virol* 85: 1117-1124.
792. Guu TS, Liu Z, Ye Q, Mata DA, Li K, et al. (2009) Structure of the hepatitis E virus-like particle suggests mechanisms for virus assembly and receptor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 12992-12997.
793. Meng J, Dai X, Chang JC, Lopareva E, Pillot J, et al. (2001) Identification and characterization of the neutralization epitope(s) of the hepatitis E virus. *Virology* 288: 203-211.
794. Xing L, Li TC, Mayazaki N, Simon MN, Wall JS, et al. (2010) Structure of hepatitis E virion-sized particle reveals an RNA-dependent viral assembly pathway. *J Biol Chem* 285: 33175-33183.
795. Zhou YH, Purcell RH, Emerson SU (2005) A truncated ORF2 protein contains the most immunogenic site on ORF2: antibody responses to non-vaccine sequences following challenge of vaccinated and non-vaccinated macaques with hepatitis E virus. *Vaccine* 23: 3157-3165.
796. Montpellier C, Wychowski C, Sayed IM, Meunier JC, Saliou JM, et al. (2018) Hepatitis E Virus Lifecycle and Identification of 3 Forms of the ORF2 Capsid Protein. *Gastroenterology* 154: 211-223 e218.
797. Yamada K, Takahashi M, Hoshino Y, Takahashi H, Ichiyama K, et al. (2009) ORF3 protein of hepatitis E virus is essential for virion release from infected cells. *J Gen Virol* 90: 1880-1891.
798. Nagashima S, Takahashi M, Jirintai S, Tanaka T, Nishizawa T, et al. (2011) Tumour susceptibility gene 101 and the vacuolar protein sorting pathway are required for the release of hepatitis E virions. *J Gen Virol* 92: 2838-2848.
799. Ding Q, Heller B, Capuccino JM, Song B, Nimgaonkar I, et al. (2017) Hepatitis E virus ORF3 is a functional ion channel required for release of infectious particles. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
800. Kang S, Myoung J (2017) Host Innate Immunity against Hepatitis E Virus and Viral Evasion Mechanisms. *J Microbiol Biotechnol* 27: 1727-1735.
801. Nair VP, Anang S, Subramani C, Madhvi A, Bakshi K, et al. (2016) Endoplasmic Reticulum Stress Induced Synthesis of a Novel Viral Factor Mediates Efficient Replication of Genotype-1 Hepatitis E Virus. *PLoS Pathog* 12: e1005521.
802. Feng Z, Hensley L, McKnight KL, Hu F, Madden V, et al. (2013) A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes. *Nature* 496: 367-371.
803. Takahashi M, Yamada K, Hoshino Y, Takahashi H, Ichiyama K, et al. (2008) Monoclonal antibodies raised against the ORF3 protein of hepatitis E virus (HEV) can

- capture HEV particles in culture supernatant and serum but not those in feces. *Arch Virol* 153: 1703-1713.
804. Takahashi M, Tanaka T, Takahashi H, Hoshino Y, Nagashima S, et al. (2010) Hepatitis E Virus (HEV) strains in serum samples can replicate efficiently in cultured cells despite the coexistence of HEV antibodies: characterization of HEV virions in blood circulation. *J Clin Microbiol* 48: 1112-1125.
 805. Chapuy-Regaud S, Dubois M, Plisson-Chastang C, Bonnefois T, Lhomme S, et al. (2017) Characterization of the lipid envelope of exosome encapsulated HEV particles protected from the immune response. *Biochimie* 141: 70-79.
 806. Nagashima S, Takahashi M, Kobayashi T, Nishizawa T, Nishiyama T, et al. (2017) Characterization of the Quasi-Enveloped Hepatitis E Virus Particles Released by the Cellular Exosomal Pathway. *J Virol* 91.
 807. Okamoto H (2013) Culture systems for hepatitis E virus. *J Gastroenterol* 48: 147-158.
 808. Kalia M, Chandra V, Rahman SA, Sehgal D, Jameel S (2009) Heparan sulfate proteoglycans are required for cellular binding of the hepatitis E virus ORF2 capsid protein and for viral infection. *J Virol* 83: 12714-12724.
 809. Kapur N, Thakral D, Durgapal H, Panda SK (2012) Hepatitis E virus enters liver cells through receptor-dependent clathrin-mediated endocytosis. *J Viral Hepat* 19: 436-448.
 810. Yin X, Ambardekar C, Lu Y, Feng Z (2016) Distinct Entry Mechanisms for Nonenveloped and Quasi-Enveloped Hepatitis E Viruses. *J Virol* 90: 4232-4242.
 811. Graff J, Torian U, Nguyen H, Emerson SU (2006) A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus. *J Virol* 80: 5919-5926.
 812. Zheng ZZ, Miao J, Zhao M, Tang M, Yeo AE, et al. (2010) Role of heat-shock protein 90 in hepatitis E virus capsid trafficking. *J Gen Virol* 91: 1728-1736.
 813. Nagashima S, Takahashi M, Jirintai S, Tanggis, Kobayashi T, et al. (2014) The membrane on the surface of hepatitis E virus particles is derived from the intracellular membrane and contains trans-Golgi network protein 2. *Arch Virol* 159: 979-991.
 814. Wen GP, Tang ZM, Yang F, Zhang K, Ji WF, et al. (2015) A valuable antigen detection method for diagnosis of acute hepatitis E. *J Clin Microbiol* 53: 782-788.
 815. Geng Y, Zhao C, Huang W, Harrison TJ, Zhang H, et al. (2016) Detection and assessment of infectivity of hepatitis E virus in urine. *J Hepatol* 64: 37-43.
 816. Guillois Y, Abravanel F, Miura T, Pavo N, Vaillant V, et al. (2016) High Proportion of Asymptomatic Infections in an Outbreak of Hepatitis E Associated With a Spit-Roasted Piglet, France, 2013. *Clin Infect Dis* 62: 351-357.
 817. Rein DB, Stevens GA, Theaker J, Wittenborn JS, Wiersma ST (2012) The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005. *Hepatology* 55: 988-997.
 818. Kamar N, Dalton HR, Abravanel F, Izopet J (2014) Hepatitis E virus infection. *Clin Microbiol Rev* 27: 116-138.
 819. Dalton HR, Thuraiajah PH, Fellows HJ, Hussaini HS, Mitchell J, et al. (2007) Autochthonous hepatitis E in southwest England. *J Viral Hepat* 14: 304-309.
 820. Kamar N, Rostaing L, Legrand-Abravanel F, Izopet J (2013) How should hepatitis E virus infection be defined in organ-transplant recipients? *Am J Transplant* 13: 1935-1936.
 821. Geng Y, Zhang H, Huang W, T JH, Geng K, et al. (2014) Persistent hepatitis e virus genotype 4 infection in a child with acute lymphoblastic leukemia. *Hepat Mon* 14: e15618.

822. Sridhar S, Chan JFW, Yap DYH, Teng JLL, Huang C, et al. (2018) Genotype 4 hepatitis E virus is a cause of chronic hepatitis in renal transplant recipients in Hong Kong. *J Viral Hepat* 25: 209-213.
823. Dalton HR, Bendall RP, Keane FE, Tedder RS, Ijaz S (2009) Persistent carriage of hepatitis E virus in patients with HIV infection. *N Engl J Med* 361: 1025-1027.
824. le Coutre P, Meisel H, Hofmann J, Rocken C, Vuong GL, et al. (2009) Reactivation of hepatitis E infection in a patient with acute lymphoblastic leukaemia after allogeneic stem cell transplantation. *Gut* 58: 699-702.
825. Tavitian S, Peron JM, Huynh A, Mansuy JM, Ysebaert L, et al. (2010) Hepatitis E virus excretion can be prolonged in patients with hematological malignancies. *J Clin Virol* 49: 141-144.
826. Kamar N, Selves J, Mansuy JM, Ouezzani L, Peron JM, et al. (2008) Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* 358: 811-817.
827. Kamar N, Garrouste C, Haagsma EB, Garrigue V, Pischke S, et al. (2011) Factors associated with chronic hepatitis in patients with hepatitis E virus infection who have received solid organ transplants. *Gastroenterology* 140: 1481-1489.
828. Kamar N, Abravanel F, Selves J, Garrouste C, Esposito L, et al. (2010) Influence of immunosuppressive therapy on the natural history of genotype 3 hepatitis-E virus infection after organ transplantation. *Transplantation* 89: 353-360.
829. Kamar N, Izopet J, Tripon S, Bismuth M, Hillaire S, et al. (2014) Ribavirin for chronic hepatitis E virus infection in transplant recipients. *N Engl J Med* 370: 1111-1120.
830. Haagsma EB, Riezebos-Brilman A, van den Berg AP, Porte RJ, Niesters HG (2010) Treatment of chronic hepatitis E in liver transplant recipients with pegylated interferon alpha-2b. *Liver Transpl* 16: 474-477.
831. Kamar N, Abravanel F, Garrouste C, Cardeau-Desangles I, Mansuy JM, et al. (2010) Three-month pegylated interferon-alpha-2a therapy for chronic hepatitis E virus infection in a haemodialysis patient. *Nephrol Dial Transplant* 25: 2792-2795.
832. Todt D, Walter S, Brown RJ, Steinmann E (2016) Mutagenic Effects of Ribavirin on Hepatitis E Virus-Viral Extinction versus Selection of Fitness-Enhancing Mutations. *Viruses* 8.
833. Debing Y, Emerson SU, Wang Y, Pan Q, Balzarini J, et al. (2014) Ribavirin inhibits in vitro hepatitis E virus replication through depletion of cellular GTP pools and is moderately synergistic with alpha interferon. *Antimicrob Agents Chemother* 58: 267-273.
834. Todt D, Gisa A, Radonic A, Nitsche A, Behrendt P, et al. (2016) In vivo evidence for ribavirin-induced mutagenesis of the hepatitis E virus genome. *Gut* 65: 1733-1743.
835. Wang Y, Zhou X, Debing Y, Chen K, Van Der Laan LJ, et al. (2014) Calcineurin inhibitors stimulate and mycophenolic acid inhibits replication of hepatitis E virus. *Gastroenterology* 146: 1775-1783.
836. Drave SA, Debing Y, Walter S, Todt D, Engelmann M, et al. (2016) Extra-hepatic replication and infection of hepatitis E virus in neuronal-derived cells. *J Viral Hepat* 23: 512-521.
837. Emerson SU, Nguyen H, Graff J, Stephany DA, Brockington A, et al. (2004) In vitro replication of hepatitis E virus (HEV) genomes and of an HEV replicon expressing green fluorescent protein. *J Virol* 78: 4838-4846.
838. Zhou X, Huang F, Xu L, Lin Z, de Vrij FMS, et al. (2017) Hepatitis E Virus Infects Neurons and Brains. *J Infect Dis* 215: 1197-1206.
839. Dalton HR, Kamar N, van Eijk JJ, McLean BN, Cintas P, et al. (2016) Hepatitis E virus and neurological injury. *Nat Rev Neurol* 12: 77-85.
840. Despierres LA, Kaphan E, Attarian S, Cohen-Bacrie S, Pelletier J, et al. (2011) Neurologic disorders and hepatitis E, France, 2010. *Emerg Infect Dis* 17: 1510-1512.

841. Kamar N, Weclawiak H, Guilbeau-Frugier C, Legrand-Abravanel F, Cointault O, et al. (2012) Hepatitis E virus and the kidney in solid-organ transplant patients. *Transplantation* 93: 617-623.
842. Pischke S, Behrendt P, Manns MP, Wedemeyer H (2014) HEV-associated cryoglobulinaemia and extrahepatic manifestations of hepatitis E. *Lancet Infect Dis* 14: 678-679.
843. Colson P, Payraudeau E, Leonnet C, De Montigny S, Villeneuve L, et al. (2008) Severe thrombocytopenia associated with acute hepatitis E virus infection. *J Clin Microbiol* 46: 2450-2452.
844. Navaneethan U, Al Mohajer M, Shata MT (2008) Hepatitis E and pregnancy: understanding the pathogenesis. *Liver Int* 28: 1190-1199.
845. Patra S, Kumar A, Trivedi SS, Puri M, Sarin SK (2007) Maternal and fetal outcomes in pregnant women with acute hepatitis E virus infection. *Ann Intern Med* 147: 28-33.
846. Acharya SK, Dasarathy S, Kumer TL, Sushma S, Prasanna KS, et al. (1996) Fulminant hepatitis in a tropical population: clinical course, cause, and early predictors of outcome. *Hepatology* 23: 1448-1455.
847. Aziz AB, Hamid S, Iqbal S, Islam W, Karim SA (1997) Prevalence and severity of viral hepatitis in Pakistani pregnant women: a five year hospital based study. *J Pak Med Assoc* 47: 198-201.
848. Hussaini SH, Skidmore SJ, Richardson P, Sherratt LM, Cooper BT, et al. (1997) Severe hepatitis E infection during pregnancy. *J Viral Hepat* 4: 51-54.
849. Dilawari JB, Singh K, Chawla YK, Ramesh GN, Chauhan A, et al. (1994) Hepatitis E virus: epidemiological, clinical and serological studies of north Indian epidemic. *Indian J Gastroenterol* 13: 44-48.
850. Khuroo MS (1991) Hepatitis E: the enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Indian J Gastroenterol* 10: 96-100.
851. Khuroo MS, Kamili S (2003) Aetiology, clinical course and outcome of sporadic acute viral hepatitis in pregnancy. *J Viral Hepat* 10: 61-69.
852. Khaskheli MN, Baloch S, Sheeba A (2015) Acute Hepatitis E Viral Infection in Pregnancy and Maternal Morbidity. *J Coll Physicians Surg Pak* 25: 734-737.
853. Agrawal V, Goel A, Rawat A, Naik S, Aggarwal R (2012) Histological and immunohistochemical features in fatal acute fulminant hepatitis E. *Indian J Pathol Microbiol* 55: 22-27.
854. Jilani N, Das BC, Husain SA, Baweja UK, Chattopadhyaya D, et al. (2007) Hepatitis E virus infection and fulminant hepatic failure during pregnancy. *J Gastroenterol Hepatol* 22: 676-682.
855. Kmush BL, Labrique A, Li W, Klein SL, Schulze K, et al. (2016) The Association of Cytokines and Micronutrients with Hepatitis E Virus Infection During Pregnancy and the Postpartum Period in Rural Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg* 94: 203-211.
856. Kumar A, Devi SG, Kar P, Agarwal S, Husain SA, et al. (2014) Association of cytokines in hepatitis E with pregnancy outcome. *Cytokine* 65: 95-104.
857. Pal R, Aggarwal R, Naik SR, Das V, Das S, et al. (2005) Immunological alterations in pregnant women with acute hepatitis E. *J Gastroenterol Hepatol* 20: 1094-1101.
858. Prabhu SB, Gupta P, Durgapal H, Rath S, Gupta SD, et al. (2011) Study of cellular immune response against Hepatitis E virus (HEV). *J Viral Hepat* 18: 587-594.
859. Salam GD, Kumar A, Kar P, Aggarwal S, Husain A, et al. (2013) Serum tumor necrosis factor-alpha level in hepatitis E virus-related acute viral hepatitis and fulminant hepatic failure in pregnant women. *Hepatol Res* 43: 826-835.
860. Sharma S, Kumar A, Kar P, Agarwal S, Ramji S, et al. (2017) Risk factors for vertical transmission of hepatitis E virus infection. *J Viral Hepat* 24: 1067-1075.

861. Khuroo MS, Kamili S, Jameel S (1995) Vertical transmission of hepatitis E virus. *Lancet* 345: 1025-1026.
862. Kumar A, Beniwal M, Kar P, Sharma JB, Murthy NS (2004) Hepatitis E in pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet* 85: 240-244.
863. Bose PD, Das BC, Hazam RK, Kumar A, Medhi S, et al. (2014) Evidence of extrahepatic replication of hepatitis E virus in human placenta. *J Gen Virol* 95: 1266-1271.
864. Khuroo MS, Kamili S (2009) Clinical course and duration of viremia in vertically transmitted hepatitis E virus (HEV) infection in babies born to HEV-infected mothers. *J Viral Hepat* 16: 519-523.
865. Borkakoti J, Hazam RK, Mohammad A, Kumar A, Kar P (2013) Does high viral load of hepatitis E virus influence the severity and prognosis of acute liver failure during pregnancy? *J Med Virol* 85: 620-626.
866. Bose PD, Das BC, Kumar A, Gondal R, Kumar D, et al. (2011) High viral load and deregulation of the progesterone receptor signaling pathway: association with hepatitis E-related poor pregnancy outcome. *J Hepatol* 54: 1107-1113.
867. Chaudhry SA, Verma N, Koren G (2015) Hepatitis E infection during pregnancy. *Can Fam Physician* 61: 607-608.
868. Sayed IM, Vercoouter AS, Abdelwahab SF, Vercauteren K, Meuleman P (2015) Is hepatitis E virus an emerging problem in industrialized countries? *Hepatology* 62: 1883-1892.
869. Stoszek SK, Abdel-Hamid M, Saleh DA, El Kafrawy S, Narooz S, et al. (2006) High prevalence of hepatitis E antibodies in pregnant Egyptian women. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100: 95-101.
870. Anty R, Ollier L, Peron JM, Nicand E, Cannavo I, et al. (2012) First case report of an acute genotype 3 hepatitis E infected pregnant woman living in South-Eastern France. *J Clin Virol* 54: 76-78.
871. Tabatabai J, Wenzel JJ, Soboletzki M, Flux C, Navid MH, et al. (2014) First case report of an acute hepatitis E subgenotype 3c infection during pregnancy in Germany. *J Clin Virol* 61: 170-172.
872. Charre C, Ramiere C, Dumortier J, Abravanel F, Lhomme S, et al. (2018) Chronic Genotype 3 Hepatitis E in Pregnant Woman Receiving Infliximab and Azathioprine. *Emerg Infect Dis* 24: 941-943.
873. Tanaka T, Takahashi M, Kusano E, Okamoto H (2007) Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus. *J Gen Virol* 88: 903-911.
874. McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O'Garra A (2015) Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol* 15: 87-103.
875. Devhare PB, Chatterjee SN, Arankalle VA, Lole KS (2013) Analysis of antiviral response in human epithelial cells infected with hepatitis E virus. *PLoS One* 8: e63793.
876. Yin X, Li X, Ambardekar C, Hu Z, Lhomme S, et al. (2017) Hepatitis E virus persists in the presence of a type III interferon response. *PLoS Pathog* 13: e1006417.
877. Xu L, Wang W, Li Y, Zhou X, Yin Y, et al. (2017) RIG-I is a key antiviral interferon-stimulated gene against hepatitis E virus regardless of interferon production. *Hepatology* 65: 1823-1839.
878. Xu L, Zhou X, Wang W, Wang Y, Yin Y, et al. (2016) IFN regulatory factor 1 restricts hepatitis E virus replication by activating STAT1 to induce antiviral IFN-stimulated genes. *FASEB J* 30: 3352-3367.
879. Tripathy AS, Das R, Rathod SB, Arankalle VA (2012) Cytokine profiles, CTL response and T cell frequencies in the peripheral blood of acute patients and individuals recovered from hepatitis E infection. *PLoS One* 7: e31822.

880. Tripathy AS, Das R, Rathod SB, Gurav YK, Arankalle VA (2012) Peripheral T regulatory cells and cytokines in hepatitis E infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31: 179-184.
881. Sehgal R, Patra S, David P, Vyas A, Khanam A, et al. (2015) Impaired monocyte-macrophage functions and defective Toll-like receptor signaling in hepatitis E virus-infected pregnant women with acute liver failure. *Hepatology* 62: 1683-1696.
882. Moal V, Textoris J, Ben Amara A, Mehraj V, Berland Y, et al. (2013) Chronic hepatitis E virus infection is specifically associated with an interferon-related transcriptional program. *J Infect Dis* 207: 125-132.
883. Sayed IM, Verhoye L, Cocquerel L, Abravanel F, Foquet L, et al. (2017) Study of hepatitis E virus infection of genotype 1 and 3 in mice with humanised liver. *Gut* 66: 920-929.
884. Todt D, Francois C, Anggakusuma, Behrendt P, Engelmann M, et al. (2016) Antiviral Activities of Different Interferon Types and Subtypes against Hepatitis E Virus Replication. *Antimicrob Agents Chemother* 60: 2132-2139.
885. Wang W, Xu L, Brandsma JH, Wang Y, Hakim MS, et al. (2016) Convergent Transcription of Interferon-stimulated Genes by TNF-alpha and IFN-alpha Augments Antiviral Activity against HCV and HEV. *Sci Rep* 6: 25482.
886. Dong C, Zafrullah M, Mixson-Hayden T, Dai X, Liang J, et al. (2012) Suppression of interferon-alpha signaling by hepatitis E virus. *Hepatology* 55: 1324-1332.
887. Wang W, Wang Y, Qu C, Wang S, Zhou J, et al. (2018) The RNA genome of hepatitis E virus robustly triggers an antiviral interferon response. *Hepatology* 67: 2096-2112.
888. Nemeth E, Baird AW, O'Farrelly C (2009) Microanatomy of the liver immune system. *Semin Immunopathol* 31: 333-343.
889. Srivastava R, Aggarwal R, Bhagat MR, Chowdhury A, Naik S (2008) Alterations in natural killer cells and natural killer T cells during acute viral hepatitis E. *J Viral Hepat* 15: 910-916.
890. Abravanel F, Lhomme S, Chapuy-Regaud S, Mansuy JM, Muscari F, et al. (2014) Hepatitis E virus reinfections in solid-organ-transplant recipients can evolve into chronic infections. *J Infect Dis* 209: 1900-1906.
891. Husain MM, Aggarwal R, Kumar D, Jameel S, Naik S (2011) Effector T cells immune reactivity among patients with acute hepatitis E. *J Viral Hepat* 18: e603-608.
892. Shata MT, Barrett A, Shire NJ, Abdelwahab SF, Sobhy M, et al. (2007) Characterization of hepatitis E-specific cell-mediated immune response using IFN-gamma ELISPOT assay. *J Immunol Methods* 328: 152-161.
893. TrehanPati N, Sukriti S, Geffers R, Hissar S, Riese P, et al. (2011) Gene expression profiles of T cells from hepatitis E virus infected patients in acute and resolving phase. *J Clin Immunol* 31: 498-508.
894. Suneetha PV, Pischke S, Schlaphoff V, Grabowski J, Fyttili P, et al. (2012) Hepatitis E virus (HEV)-specific T-cell responses are associated with control of HEV infection. *Hepatology* 55: 695-708.
895. Brown A, Halliday JS, Swadling L, Madden RG, Bendall R, et al. (2016) Characterization of the Specificity, Functionality, and Durability of Host T-Cell Responses Against the Full-Length Hepatitis E Virus. *Hepatology* 64: 1934-1950.
896. Tam AW, White R, Yarbough PO, Murphy BJ, McAtee CP, et al. (1997) In vitro infection and replication of hepatitis E virus in primary cynomolgus macaque hepatocytes. *Virology* 238: 94-102.
897. Kazachkov Yu A, Balayan MS, Ivannikova TA, Panina LI, Orlova TM, et al. (1992) Hepatitis E virus in cultivated cells. *Arch Virol* 127: 399-402.
898. Huang R, Nakazono N, Ishii K, Li D, Kawamata O, et al. (1995) Hepatitis E virus (87A strain) propagated in A549 cells. *J Med Virol* 47: 299-302.

899. Tanaka T, Takahashi M, Takahashi H, Ichiyama K, Hoshino Y, et al. (2009) Development and characterization of a genotype 4 hepatitis E virus cell culture system using a HE-JF5/15F strain recovered from a fulminant hepatitis patient. *J Clin Microbiol* 47: 1906-1910.
900. Shukla P, Nguyen HT, Torian U, Engle RE, Faulk K, et al. (2011) Cross-species infections of cultured cells by hepatitis E virus and discovery of an infectious virus-host recombinant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 2438-2443.
901. Lhomme S, Abravanel F, Dubois M, Sandres-Saune K, Mansuy JM, et al. (2014) Characterization of the polyproline region of the hepatitis E virus in immunocompromised patients. *J Virol* 88: 12017-12025.
902. Nguyen HT, Torian U, Faulk K, Mather K, Engle RE, et al. (2012) A naturally occurring human/hepatitis E recombinant virus predominates in serum but not in faeces of a chronic hepatitis E patient and has a growth advantage in cell culture. *J Gen Virol* 93: 526-530.
903. Helsen N, Debing Y, Paeshuyse J, Dallmeier K, Boon R, et al. (2016) Stem cell-derived hepatocytes: A novel model for hepatitis E virus replication. *J Hepatol* 64: 565-573.
904. Wu X, Dao Thi VL, Liu P, Takacs CN, Xiang K, et al. (2018) Pan-Genotype Hepatitis E Virus Replication in Stem Cell-Derived Hepatocellular Systems. *Gastroenterology* 154: 663-674 e667.
905. Knegendorf L, Drave SA, Dao Thi VL, Debing Y, Brown RJP, et al. (2018) Hepatitis E virus replication and interferon responses in human placental cells. *Hepatol Commun* 2: 173-187.
906. Li X, Kamili S, Krawczynski K (2006) Quantitative detection of hepatitis E virus RNA and dynamics of viral replication in experimental infection. *J Viral Hepat* 13: 835-839.
907. Tsarev SA, Emerson SU, Tsareva TS, Yarbough PO, Lewis M, et al. (1993) Variation in course of hepatitis E in experimentally infected cynomolgus monkeys. *J Infect Dis* 167: 1302-1306.
908. Yu C, Boon D, McDonald SL, Myers TG, Tomioka K, et al. (2010) Pathogenesis of hepatitis E virus and hepatitis C virus in chimpanzees: similarities and differences. *J Virol* 84: 11264-11278.
909. Tsarev SA, Tsareva TS, Emerson SU, Rippey MK, Zack P, et al. (1995) Experimental hepatitis E in pregnant rhesus monkeys: failure to transmit hepatitis E virus (HEV) to offspring and evidence of naturally acquired antibodies to HEV. *J Infect Dis* 172: 31-37.
910. Wang L, Xia J, Wang Y (2017) Experimental infection of rabbits with genotype 3 hepatitis E virus produced both chronicity and kidney injury. *Gut* 66: 561-562.
911. Xia J, Liu L, Wang L, Zhang Y, Zeng H, et al. (2015) Experimental infection of pregnant rabbits with hepatitis E virus demonstrating high mortality and vertical transmission. *J Viral Hepat* 22: 850-857.
912. Usmanov RK, Balaian MS, Dzhumalieva DI, Alymbaeva DB, Korolev MB, et al. (1991) [Experimental hepatitis E infection in piglets]. *Vopr Virusol* 36: 212-216.
913. Cao D, Cao QM, Subramaniam S, Yugo DM, Heffron CL, et al. (2017) Pig model mimicking chronic hepatitis E virus infection in immunocompromised patients to assess immune correlates during chronicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: 6914-6923.
914. Salines M, Barnaud E, Andraud M, Eono F, Renson P, et al. (2015) Hepatitis E virus chronic infection of swine co-infected with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Vet Res* 46: 55.
915. Li TC, Suzaki Y, Ami Y, Tsunemitsu H, Miyamura T, et al. (2008) Mice are not susceptible to hepatitis E virus infection. *J Vet Med Sci* 70: 1359-1362.

916. van de Garde MD, Pas SD, van der Net G, de Man RA, Osterhaus AD, et al. (2016) Hepatitis E Virus (HEV) Genotype 3 Infection of Human Liver Chimeric Mice as a Model for Chronic HEV Infection. *J Virol* 90: 4394-4401.
917. Sayed IM, Meuleman P (2017) Murine Tissues of Human Liver Chimeric Mice Are Not Susceptible to Hepatitis E Virus Genotypes 1 and 3. *J Infect Dis* 216: 919-920.
918. Ming GL, Tang H, Song H (2016) Advances in Zika Virus Research: Stem Cell Models, Challenges, and Opportunities. *Cell Stem Cell* 19: 690-702.
919. Dick GW (1952) Zika virus. II. Pathogenicity and physical properties. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 46: 521-534.
920. Dick GW, Kitchen SF, Haddow AJ (1952) Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 46: 509-520.
921. Hayes EB (2009) Zika virus outside Africa. *Emerg Infect Dis* 15: 1347-1350.
922. Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, et al. (2009) Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med* 360: 2536-2543.
923. Musso D, Nilles EJ, Cao-Lormeau VM (2014) Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clin Microbiol Infect* 20: O595-596.
924. Basarab M, Bowman C, Aarons EJ, Cropley I (2016) Zika virus. *BMJ* 352: i1049.
925. Brasil P, Pereira JP, Jr., Moreira ME, Ribeiro Nogueira RM, Damasceno L, et al. (2016) Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *N Engl J Med* 375: 2321-2334.
926. Haddow AD, Schuh AJ, Yasuda CY, Kasper MR, Heang V, et al. (2012) Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1477.
927. Wang L, Valderramos SG, Wu A, Ouyang S, Li C, et al. (2016) From Mosquitos to Humans: Genetic Evolution of Zika Virus. *Cell Host Microbe* 19: 561-565.
928. Yuan L, Huang XY, Liu ZY, Zhang F, Zhu XL, et al. (2017) A single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. *Science* 358: 933-936.
929. Cortese M, Goellner S, Acosta EG, Neufeldt CJ, Oleksiuk O, et al. (2017) Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication Factories. *Cell Rep* 18: 2113-2123.
930. Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CK, et al. (2009) Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe* 5: 365-375.
931. Garcia-Blanco MA, Vasudevan SG, Bradrick SS, Nicchitta C (2016) Flavivirus RNA transactions from viral entry to genome replication. *Antiviral Res* 134: 244-249.
932. Jones CT, Ma L, Burgner JW, Groesch TD, Post CB, et al. (2003) Flavivirus capsid is a dimeric alpha-helical protein. *J Virol* 77: 7143-7149.
933. Rey FA, Heinz FX, Mandl C, Kunz C, Harrison SC (1995) The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* 375: 291-298.
934. Guirakhoo F, Bolin RA, Roehrig JT (1992) The Murray Valley encephalitis virus prM protein confers acid resistance to virus particles and alters the expression of epitopes within the R2 domain of E glycoprotein. *Virology* 191: 921-931.
935. Stadler K, Allison SL, Schlich J, Heinz FX (1997) Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J Virol* 71: 8475-8481.
936. Ruckert C, Weger-Lucarelli J, Garcia-Luna SM, Young MC, Byas AD, et al. (2017) Impact of simultaneous exposure to arboviruses on infection and transmission by *Aedes aegypti* mosquitoes. *Nat Commun* 8: 15412.
937. Gubler DJ (2011) Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century. *Trop Med Health* 39: 3-11.

938. Amraoui F, Atyame-Nten C, Vega-Rua A, Lourenco-de-Oliveira R, Vazeille M, et al. (2016) *Culex* mosquitoes are experimentally unable to transmit Zika virus. *Euro Surveill* 21.
939. Guo XX, Li CX, Deng YQ, Xing D, Liu QM, et al. (2016) *Culex pipiens quinquefasciatus*: a potential vector to transmit Zika virus. *Emerg Microbes Infect* 5: e102.
940. Musso D, Gubler DJ (2016) Zika Virus. *Clin Microbiol Rev* 29: 487-524.
941. Musso D, Roche C, Robin E, Nhan T, Teissier A, et al. (2015) Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg Infect Dis* 21: 359-361.
942. Mansuy JM, Pasquier C, Daudin M, Chapuy-Regaud S, Moinard N, et al. (2016) Zika virus in semen of a patient returning from a non-epidemic area. *Lancet Infect Dis* 16: 894-895.
943. Mansuy JM, Suberbielle E, Chapuy-Regaud S, Mengelle C, Bujan L, et al. (2016) Zika virus in semen and spermatozoa. *Lancet Infect Dis* 16: 1106-1107.
944. Moreira J, Peixoto TM, Siqueira AM, Lamas CC (2017) Sexually acquired Zika virus: a systematic review. *Clin Microbiol Infect* 23: 296-305.
945. Govero J, Esakky P, Scheaffer SM, Fernandez E, Drury A, et al. (2016) Zika virus infection damages the testes in mice. *Nature* 540: 438-442.
946. Matusali G, Houzet L, Satie AP, Mahe D, Aubry F, et al. (2018) Zika virus infects human testicular tissue and germ cells. *J Clin Invest*.
947. Motta IJ, Spencer BR, Cordeiro da Silva SG, Arruda MB, Dobbin JA, et al. (2016) Evidence for Transmission of Zika Virus by Platelet Transfusion. *N Engl J Med* 375: 1101-1103.
948. Besnard M, Lastere S, Teissier A, Cao-Lormeau V, Musso D (2014) Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Euro Surveill* 19.
949. Oliveira Melo AS, Malinger G, Ximenes R, Szejnfeld PO, Alves Sampaio S, et al. (2016) Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound Obstet Gynecol* 47: 6-7.
950. Calvet G, Aguiar RS, Melo ASO, Sampaio SA, de Filippis I, et al. (2016) Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect Dis* 16: 653-660.
951. Driggers RW, Ho CY, Korhonen EM, Kuivanen S, Jaaskelainen AJ, et al. (2016) Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. *N Engl J Med* 374: 2142-2151.
952. Mlakar J, Korva M, Tul N, Popovic M, Poljsak-Prijatelj M, et al. (2016) Zika Virus Associated with Microcephaly. *N Engl J Med* 374: 951-958.
953. van der Eijk AA, van Genderen PJ, Verdijk RM, Reusken CB, Mogling R, et al. (2016) Miscarriage Associated with Zika Virus Infection. *N Engl J Med* 375: 1002-1004.
954. Vouga M, Musso D, Van Mieghem T, Baud D (2016) CDC guidelines for pregnant women during the Zika virus outbreak. *Lancet* 387: 843-844.
955. Vouga M, Musso D, Panchaud A, Baud D (2016) Clinical management of pregnant women exposed to Zika virus. *Lancet Infect Dis* 16: 773.
956. Dupont-Rouzeyrol M, Biron A, O'Connor O, Huguon E, Descloux E (2016) Infectious Zika viral particles in breastmilk. *Lancet* 387: 1051.
957. Blohm GM, Lednicky JA, Marquez M, White SK, Loeb JC, et al. (2018) Evidence for Mother-to-Child Transmission of Zika Virus Through Breast Milk. *Clin Infect Dis* 66: 1120-1121.
958. Grant A, Ponia SS, Tripathi S, Balasubramaniam V, Miorin L, et al. (2016) Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. *Cell Host Microbe* 19: 882-890.

959. Lazear HM, Govero J, Smith AM, Platt DJ, Fernandez E, et al. (2016) A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis. *Cell Host Microbe* 19: 720-730.
960. Smith DR, Hollidge B, Daye S, Zeng X, Blancett C, et al. (2017) Neuropathogenesis of Zika Virus in a Highly Susceptible Immunocompetent Mouse Model after Antibody Blockade of Type I Interferon. *PLoS Negl Trop Dis* 11: e0005296.
961. Miner JJ, Cao B, Govero J, Smith AM, Fernandez E, et al. (2016) Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. *Cell* 165: 1081-1091.
962. Cugola FR, Fernandes IR, Russo FB, Freitas BC, Dias JL, et al. (2016) The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature* 534: 267-271.
963. Vermillion MS, Lei J, Shabi Y, Baxter VK, Crilly NP, et al. (2017) Intrauterine Zika virus infection of pregnant immunocompetent mice models transplacental transmission and adverse perinatal outcomes. *Nat Commun* 8: 14575.
964. Dudley DM, Aliota MT, Mohr EL, Weiler AM, Lehrer-Brey G, et al. (2016) A rhesus macaque model of Asian-lineage Zika virus infection. *Nat Commun* 7: 12204.
965. Osuna CE, Lim SY, Deleage C, Griffin BD, Stein D, et al. (2016) Zika viral dynamics and shedding in rhesus and cynomolgus macaques. *Nat Med* 22: 1448-1455.
966. Dudley DM, Van Rompay KK, Coffey LL, Ardeshtir A, Keesler RI, et al. (2018) Miscarriage and stillbirth following maternal Zika virus infection in nonhuman primates. *Nat Med* 24: 1104-1107.
967. El Costa H, Gouilly J, Mansuy JM, Chen Q, Levy C, et al. (2016) ZIKA virus reveals broad tissue and cell tropism during the first trimester of pregnancy. *Sci Rep* 6: 35296.
968. Tabata T, Petitt M, Puerta-Guardo H, Michlmayr D, Wang C, et al. (2016) Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells, Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. *Cell Host Microbe* 20: 155-166.
969. Weisblum Y, Oiknine-Djian E, Vorontsov OM, Haimov-Kochman R, Zakay-Rones Z, et al. (2016) Zika virus infects early- and mid-gestation human maternal-decidual tissues, inducing distinct innate tissue responses in the maternal-fetal interface. *J Virol*.
970. Liu S, DeLalio LJ, Isakson BE, Wang TT (2016) AXL-Mediated Productive Infection of Human Endothelial Cells by Zika Virus. *Circ Res*.
971. Quicke KM, Bowen JR, Johnson EL, McDonald CE, Ma H, et al. (2016) Zika Virus Infects Human Placental Macrophages. *Cell Host Microbe* 20: 83-90.
972. Petitt M, Tabata T, Puerta-Guardo H, Harris E, Pereira L (2017) Zika virus infection of first-trimester human placentas: utility of an explant model of replication to evaluate correlates of immune protection ex vivo. *Curr Opin Virol* 27: 48-56.
973. Corry J, Arora N, Good CA, Sadovsky Y, Coyne CB (2017) Organotypic models of type III interferon-mediated protection from Zika virus infections at the maternal-fetal interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: 9433-9438.
974. Chen J, Liang Y, Yi P, Xu L, Hawkins HK, et al. (2017) Outcomes of Congenital Zika Disease Depend on Timing of Infection and Maternal-Fetal Interferon Action. *Cell Rep* 21: 1588-1599.
975. Jagger BW, Miner JJ, Cao B, Arora N, Smith AM, et al. (2017) Gestational Stage and IFN-lambda Signaling Regulate ZIKV Infection In Utero. *Cell Host Microbe* 22: 366-376 e363.
976. Hanners NW, Eitson JL, Usui N, Richardson RB, Wexler EM, et al. (2016) Western Zika Virus in Human Fetal Neural Progenitors Persists Long Term with Partial Cytopathic and Limited Immunogenic Effects. *Cell Rep* 15: 2315-2322.

977. Tang H, Hammack C, Ogden SC, Wen Z, Qian X, et al. (2016) Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Cell Stem Cell* 18: 587-590.
978. Devhare P, Meyer K, Steele R, Ray RB, Ray R (2017) Zika virus infection dysregulates human neural stem cell growth and inhibits differentiation into neuroprogenitor cells. *Cell Death Dis* 8: e3106.
979. Meertens L, Labeau A, Dejarnac O, Cipriani S, Sinigaglia L, et al. (2017) Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. *Cell Rep* 18: 324-333.
980. Bayless NL, Greenberg RS, Swigut T, Wysocka J, Blish CA (2016) Zika Virus Infection Induces Cranial Neural Crest Cells to Produce Cytokines at Levels Detrimental for Neurogenesis. *Cell Host Microbe* 20: 423-428.
981. Li C, Xu D, Ye Q, Hong S, Jiang Y, et al. (2016) Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. *Cell Stem Cell* 19: 672.
982. Chavali PL, Stojic L, Meredith LW, Joseph N, Nahorski MS, et al. (2017) Neurodevelopmental protein Musashi-1 interacts with the Zika genome and promotes viral replication. *Science* 357: 83-88.
983. Sakakibara S, Nakamura Y, Yoshida T, Shibata S, Koike M, et al. (2002) RNA-binding protein Musashi family: roles for CNS stem cells and a subpopulation of ependymal cells revealed by targeted disruption and antisense ablation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15194-15199.
984. Mavigner M, Raper J, Kovacs-Balint Z, Gumber S, O'Neal JT, et al. (2018) Postnatal Zika virus infection is associated with persistent abnormalities in brain structure, function, and behavior in infant macaques. *Sci Transl Med* 10.
985. Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, et al. (2015) Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J Virol* 89: 8880-8896.
986. Dejarnac O, Hafirassou ML, Chazal M, Versapuech M, Gaillard J, et al. (2018) TIM-1 Ubiquitination Mediates Dengue Virus Entry. *Cell Rep* 23: 1779-1793.
987. Meertens L, Carnec X, Lecoine MP, Ramdasi R, Guivel-Benhassine F, et al. (2012) The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry. *Cell Host Microbe* 12: 544-557.
988. Tassaneetrithep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpfheller C, Finke J, et al. (2003) DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med* 197: 823-829.
989. Amara A, Mercer J (2015) Viral apoptotic mimicry. *Nat Rev Microbiol* 13: 461-469.
990. Wells MF, Salick MR, Wiskow O, Ho DJ, Worringer KA, et al. (2016) Genetic Ablation of AXL Does Not Protect Human Neural Progenitor Cells and Cerebral Organoids from Zika Virus Infection. *Cell Stem Cell* 19: 703-708.
991. Hastings AK, Yockey LJ, Jagger BW, Hwang J, Uraki R, et al. (2017) TAM Receptors Are Not Required for Zika Virus Infection in Mice. *Cell Rep* 19: 558-568.
992. Kaid C, Goulart E, Caires-Junior LC, Araujo BHS, Soares-Schanoski A, et al. (2018) Zika Virus Selectively Kills Aggressive Human Embryonal CNS Tumor Cells In Vitro and In Vivo. *Cancer Res* 78: 3363-3374.
993. Zhu Z, Gorman MJ, McKenzie LD, Chai JN, Hubert CG, et al. (2017) Zika virus has oncolytic activity against glioblastoma stem cells. *J Exp Med* 214: 2843-2857.
994. Bowen JR, Quicke KM, Maddur MS, O'Neal JT, McDonald CE, et al. (2017) Zika Virus Antagonizes Type I Interferon Responses during Infection of Human Dendritic Cells. *PLoS Pathog* 13: e1006164.
995. Sun X, Hua S, Chen HR, Ouyang Z, Einkauf K, et al. (2017) Transcriptional Changes during Naturally Acquired Zika Virus Infection Render Dendritic Cells Highly Conducive to Viral Replication. *Cell Rep* 21: 3471-3482.

996. Lang J, Cheng Y, Rolfe A, Hammack C, Vera D, et al. (2018) An hPSC-Derived Tissue-Resident Macrophage Model Reveals Differential Responses of Macrophages to ZIKV and DENV Infection. *Stem Cell Reports*.
997. Foo SS, Chen W, Chan Y, Bowman JW, Chang LC, et al. (2017) Asian Zika virus strains target CD14(+) blood monocytes and induce M2-skewed immunosuppression during pregnancy. *Nat Microbiol* 2: 1558-1570.
998. Michlmayr D, Andrade P, Gonzalez K, Balmaseda A, Harris E (2017) CD14(+)CD16(+) monocytes are the main target of Zika virus infection in peripheral blood mononuclear cells in a paediatric study in Nicaragua. *Nat Microbiol* 2: 1462-1470.
999. Pingen M, Bryden SR, Pondeville E, Schnettler E, Kohl A, et al. (2016) Host Inflammatory Response to Mosquito Bites Enhances the Severity of Arbovirus Infection. *Immunity* 44: 1455-1469.
1000. Glasner A, Oiknine-Djian E, Weisblum Y, Diab M, Panet A, et al. (2017) Zika Virus Escapes NK Cell Detection by Upregulating Major Histocompatibility Complex Class I Molecules. *J Virol* 91.
1001. Pardy RD, Rajah MM, Condotta SA, Taylor NG, Sagan SM, et al. (2017) Analysis of the T Cell Response to Zika Virus and Identification of a Novel CD8+ T Cell Epitope in Immunocompetent Mice. *PLoS Pathog* 13: e1006184.
1002. Regla-Nava JA, Elong Ngono A, Viramontes KM, Huynh AT, Wang YT, et al. (2018) Cross-reactive Dengue virus-specific CD8(+) T cells protect against Zika virus during pregnancy. *Nat Commun* 9: 3042.
1003. Wen J, Tang WW, Sheets N, Ellison J, Sette A, et al. (2017) Identification of Zika virus epitopes reveals immunodominant and protective roles for dengue virus cross-reactive CD8(+) T cells. *Nat Microbiol* 2: 17036.
1004. Jurado KA, Yockey LJ, Wong PW, Lee S, Huttner AJ, et al. (2018) Antiviral CD8 T cells induce Zika-virus-associated paralysis in mice. *Nat Microbiol* 3: 141-147.
1005. Sapparapu G, Fernandez E, Kose N, Bin C, Fox JM, et al. (2016) Neutralizing human antibodies prevent Zika virus replication and fetal disease in mice. *Nature* 540: 443-447.
1006. Wang S, Hong S, Deng YQ, Ye Q, Zhao LZ, et al. (2016) Transfer of convalescent serum to pregnant mice prevents Zika virus infection and microcephaly in offspring. *Cell Res*.
1007. Pardi N, Hogan MJ, Pelc RS, Muramatsu H, Andersen H, et al. (2017) Zika virus protection by a single low-dose nucleoside-modified mRNA vaccination. *Nature* 543: 248-251.
1008. Richner JM, Himansu S, Dowd KA, Butler SL, Salazar V, et al. (2017) Modified mRNA Vaccines Protect against Zika Virus Infection. *Cell* 168: 1114-1125 e1110.
1009. Richner JM, Jagger BW, Shan C, Fontes CR, Dowd KA, et al. (2017) Vaccine Mediated Protection Against Zika Virus-Induced Congenital Disease. *Cell* 170: 273-283 e212.
1010. Turner LH, Kinder JM, Wilburn A, D'Mello RJ, Braunlin MR, et al. (2017) Preconceptual Zika virus asymptomatic infection protects against secondary prenatal infection. *PLoS Pathog* 13: e1006684.
1011. Siewiera J, Gouilly J, Hocine HR, Cartron G, Levy C, et al. (2015) Natural cytotoxicity receptor splice variants orchestrate the distinct functions of human natural killer cell subtypes. *Nat Commun* 6: 10183.
1012. Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R (2012) Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol* 12: 191-200.
1013. Kendall RT, Feghali-Bostwick CA (2014) Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Front Pharmacol* 5: 123.

1014. Lash GE, Pitman H, Morgan HL, Innes BA, Agwu CN, et al. (2016) Decidual macrophages: key regulators of vascular remodeling in human pregnancy. *J Leukoc Biol* 100: 315-325.
1015. Fernandez-Garcia MD, Mazzon M, Jacobs M, Amara A (2009) Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. *Cell Host Microbe* 5: 318-328.
1016. Kwon A, Kim Y, Kim M, Kim J, Choi H, et al. (2016) Tissue-specific Differentiation Potency of Mesenchymal Stromal Cells from Perinatal Tissues. *Sci Rep* 6: 23544.
1017. Kovacs IJ, Hegedus K, Pal A, Pusztai R (2007) Production of proinflammatory cytokines by syncytiotrophoblasts infected with human cytomegalovirus isolates. *Placenta* 28: 620-623.
1018. Du MR, Wang SC, Li DJ (2014) The integrative roles of chemokines at the maternal-fetal interface in early pregnancy. *Cell Mol Immunol* 11: 438-448.
1019. Rosenberg AZ, Yu W, Hill DA, Reyes CA, Schwartz DA (2017) Placental Pathology of Zika Virus: Viral Infection of the Placenta Induces Villous Stromal Macrophage (Hofbauer Cell) Proliferation and Hyperplasia. *Arch Pathol Lab Med* 141: 43-48.
1020. Witkowska AM (2005) Soluble ICAM-1: a marker of vascular inflammation and lifestyle. *Cytokine* 31: 127-134.
1021. Abrahams VM, Straszewski-Chavez SL, Guller S, Mor G (2004) First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis. *Mol Hum Reprod* 10: 55-63.
1022. Tabata T, Petitt M, Fang-Hoover J, Rivera J, Nozawa N, et al. (2012) Cytomegalovirus impairs cytotrophoblast-induced lymphangiogenesis and vascular remodeling in an in vivo human placentation model. *Am J Pathol* 181: 1540-1559.
1023. Jonsson Y, Ruber M, Matthiesen L, Berg G, Nieminen K, et al. (2006) Cytokine mapping of sera from women with preeclampsia and normal pregnancies. *J Reprod Immunol* 70: 83-91.
1024. Sekiyama KD, Yoshida M, Thomson AW (1994) Circulating proinflammatory cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, and IL-6) and IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) in fulminant hepatic failure and acute hepatitis. *Clin Exp Immunol* 98: 71-77.
1025. Christiansen OB, Nielsen HS, Kolte AM (2006) Inflammation and miscarriage. *Semin Fetal Neonatal Med* 11: 302-308.
1026. Monel B, Compton AA, Bruel T, Amraoui S, Burlaud-Gaillard J, et al. (2017) Zika virus induces massive cytoplasmic vacuolization and paraptosis-like death in infected cells. *EMBO J* 36: 1653-1668.
1027. Lenggenhager D, Weber A (2018) An Update on the Clinicopathologic Features and Pathologic Diagnosis of Hepatitis E in Liver Specimens. *Adv Anat Pathol* 25: 273-281.
1028. Soomro MH, Shi R, She R, Yang Y, Hu F, et al. (2016) Antigen detection and apoptosis in Mongolian gerbil's kidney experimentally intraperitoneally infected by swine hepatitis E virus. *Virus Res* 213: 343-352.
1029. Lash GE, Ernerudh J (2015) Decidual cytokines and pregnancy complications: focus on spontaneous miscarriage. *J Reprod Immunol* 108: 83-89.
1030. Prins JR, Gomez-Lopez N, Robertson SA (2012) Interleukin-6 in pregnancy and gestational disorders. *J Reprod Immunol* 95: 1-14.
1031. Tisoncik JR, Korth MJ, Simmons CP, Farrar J, Martin TR, et al. (2012) Into the eye of the cytokine storm. *Microbiol Mol Biol Rev* 76: 16-32.
1032. Shi C, Pamer EG (2011) Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 11: 762-774.
1033. Drebber U, Odenthal M, Aberle SW, Winkel N, Wedemeyer I, et al. (2013) Hepatitis E in liver biopsies from patients with acute hepatitis of clinically unexplained origin. *Front Physiol* 4: 351.

1034. Devhare PB, Desai S, Lole KS (2016) Innate immune responses in human hepatocyte-derived cell lines alter genotype 1 hepatitis E virus replication efficiencies. *Sci Rep* 6: 26827.
1035. van de Garde MDB, Pas SD, van Oord GW, Gama L, Choi Y, et al. (2017) Interferon-alpha treatment rapidly clears Hepatitis E virus infection in humanized mice. *Sci Rep* 7: 8267.
1036. Lasfar A, Zloza A, Cohen-Solal KA (2016) IFN-lambda therapy: current status and future perspectives. *Drug Discov Today* 21: 167-171.
1037. Syedbasha M, Egli A (2017) Interferon Lambda: Modulating Immunity in Infectious Diseases. *Front Immunol* 8: 119.
1038. Lunemann S, Schobel A, Kah J, Fittje P, Holzemer A, et al. (2018) Interactions Between KIR3DS1 and HLA-F Activate Natural Killer Cells to Control HCV Replication in Cell Culture. *Gastroenterology*.
1039. Naiyer MM, Cassidy SA, Magri A, Cowton V, Chen K, et al. (2017) KIR2DS2 recognizes conserved peptides derived from viral helicases in the context of HLA-C. *Sci Immunol* 2.
1040. Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO (2006) Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* 107: 159-166.
1041. Cerdeira AS, Rajakumar A, Royle CM, Lo A, Husain Z, et al. (2013) Conversion of peripheral blood NK cells to a decidual NK-like phenotype by a cocktail of defined factors. *J Immunol* 190: 3939-3948.
1042. Holder KA, Stapleton SN, Gallant ME, Russell RS, Grant MD (2013) Hepatitis C virus-infected cells downregulate NKp30 and inhibit ex vivo NK cell functions. *J Immunol* 191: 3308-3318.
1043. Sun C, Fu B, Gao Y, Liao X, Sun R, et al. (2012) TGF-beta1 down-regulation of NKG2D/DAP10 and 2B4/SAP expression on human NK cells contributes to HBV persistence. *PLoS Pathog* 8: e1002594.
1044. Park YP, Choi SC, Kiesler P, Gil-Krzewska A, Borrego F, et al. (2011) Complex regulation of human NKG2D-DAP10 cell surface expression: opposing roles of the gamma-c cytokines and TGF-beta1. *Blood* 118: 3019-3027.
1045. Copland IB, Adamson SL, Post M, Lye SJ, Caniggia I (2002) TGF-beta 3 expression during umbilical cord development and its alteration in pre-eclampsia. *Placenta* 23: 311-321.
1046. Hu W, Wang H, Wang Z, Huang H, Dong M (2007) Elevated serum levels of interleukin-15 and interleukin-16 in preeclampsia. *J Reprod Immunol* 73: 166-171.
1047. Huang X, Huang H, Dong M, Yao Q, Wang H (2005) Serum and placental interleukin-18 are elevated in preeclampsia. *J Reprod Immunol* 65: 77-87.
1048. Shemesh A, Tirosh D, Sheiner E, Tirosh NB, Brusilovsky M, et al. (2015) First Trimester Pregnancy Loss and the Expression of Alternatively Spliced NKp30 Isoforms in Maternal Blood and Placental Tissue. *Front Immunol* 6: 189.
1049. Fuchs A, Cella M, Kondo T, Colonna M (2005) Paradoxical inhibition of human natural interferon-producing cells by the activating receptor NKp44. *Blood* 106: 2076-2082.
1050. Wherry EJ, Ha SJ, Kaech SM, Haining WN, Sarkar S, et al. (2007) Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* 27: 670-684.
1051. Fuertes Marraco SA, Neubert NJ, Verdeil G, Speiser DE (2015) Inhibitory Receptors Beyond T Cell Exhaustion. *Front Immunol* 6: 310.
1052. Legat A, Speiser DE, Pircher H, Zehn D, Fuertes Marraco SA (2013) Inhibitory Receptor Expression Depends More Dominantly on Differentiation and Activation than "Exhaustion" of Human CD8 T Cells. *Front Immunol* 4: 455.

1053. Billerbeck E, Kang YH, Walker L, Lockstone H, Grafmueller S, et al. (2010) Analysis of CD161 expression on human CD8+ T cells defines a distinct functional subset with tissue-homing properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 3006-3011.
1054. Barathan M, Mohamed R, Saeidi A, Vadivelu J, Chang LY, et al. (2015) Increased frequency of late-senescent T cells lacking CD127 in chronic hepatitis C disease. *Eur J Clin Invest* 45: 466-474.
1055. Das A, Hoare M, Davies N, Lopes AR, Dunn C, et al. (2008) Functional skewing of the global CD8 T cell population in chronic hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 205: 2111-2124.
1056. Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, van der Most R, Ahmed R (2003) Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J Virol* 77: 4911-4927.
1057. Moran TM, Isobe H, Fernandez-Sesma A, Schulman JL (1996) Interleukin-4 causes delayed virus clearance in influenza virus-infected mice. *J Virol* 70: 5230-5235.
1058. King C, Mueller Hoenger R, Malo Cleary M, Murali-Krishna K, Ahmed R, et al. (2001) Interleukin-4 acts at the locus of the antigen-presenting dendritic cell to counter-regulate cytotoxic CD8+ T-cell responses. *Nat Med* 7: 206-214.
1059. Schwaiger S, Wolf AM, Robatscher P, Jenewein B, Grubeck-Loebenstein B (2003) IL-4-producing CD8+ T cells with a CD62L++(bright) phenotype accumulate in a subgroup of older adults and are associated with the maintenance of intact humoral immunity in old age. *J Immunol* 170: 613-619.
1060. Kienzle N, Olver S, Buttigieg K, Groves P, Janas ML, et al. (2005) Progressive differentiation and commitment of CD8+ T cells to a poorly cytolytic CD8low phenotype in the presence of IL-4. *J Immunol* 174: 2021-2029.
1061. Yen CJ, Lin SL, Huang KT, Lin RH (2000) Age-associated changes in interferon-gamma and interleukin-4 secretion by purified human CD4+ and CD8+ T cells. *J Biomed Sci* 7: 317-321.
1062. Seder RA, Darrah PA, Roederer M (2008) T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol* 8: 247-258.
1063. Behrendt P, Luth S, Dammermann W, Drave S, Brown RJ, et al. (2017) Exacerbation of hepatitis E virus infection during anti-TNFalpha treatment. *Joint Bone Spine* 84: 217-219.
1064. Boyd A, Almeida JR, Darrah PA, Sauce D, Seder RA, et al. (2015) Pathogen-Specific T Cell Polyfunctionality Is a Correlate of T Cell Efficacy and Immune Protection. *PLoS One* 10: e0128714.
1065. Betts MR, Nason MC, West SM, De Rosa SC, Migueles SA, et al. (2006) HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood* 107: 4781-4789.

Annexes



ZIKA Virus elicits different cytokine responses in human peripheral plasma and semen

Journal:	<i>Emerging Infectious Diseases</i>
Manuscript ID	EID-17-1886.R1
Manuscript Type:	Research Letter
Date Submitted by the Author:	06-Jul-2018
Complete List of Authors:	<p>MANSUY, JEAN MICHEL; VIROLOGY LABORATORY, UNIVERSITY HOSPITAL PURPAN El Costa, Hicham; Inserm 1043, virology; INSERM GOUILLY, Jordy; INSERM 1043, Virology CHU Purpan, Virology Mengelle, Catherine; University Hospital, Virology Pasquier, Christophe; VIROLOGY LABORATORY, UNIVERSITY HOSPITAL PURPAN; Centre de Physiopathologie Toulouse-Purpan, Université de Toulouse, CNRS, INSERM, UPS Martin-Blondel, Guillaume; Hopital Purpan, Infectious and tropical diseases department Izopet, Jacques; Institut Fédératif de Biologie de Purpan, Laboratoire de Virologie Jabrane-Ferrat, Nabila; INSERM 1043, Virology</p>
Keywords:	ZIKA, cytokines, semen, blood, inflammation
Abstract:	<p>We longitudinally studied Zika virus (ZIKV) RNA and a selected panel of cytokines in semen and plasma in a ZIKV infected patient. ZIKV RNA was detected in semen more than two months after the viremia disappearance and patterns of cytokines were different in semen and plasma. These results reinforce the hypothesis of a compartmentalization of ZIKV in the male genital tract.</p>

SCHOLARONE™
Manuscripts

ZIKA Virus elicits different cytokine responses in human peripheral plasma and semen

Jean-Michel Mansuy^{1*,§}, Hicham El Costa^{1,2,*}, Jordi Gouilly², Catherine Mengelle¹,
Christophe Pasquier¹, Guillaume Martin-Blondel³, Jacques Izopet^{1,2} and Nabila
Jabrane-Ferrat^{2,§}

1 Laboratoire de virologie, Institut Fédératif de Biologie, CHU Toulouse, Toulouse, 31059, France

2 Centre de Physiopathologie Toulouse-Purpan, INSERM U1043, CNRS UMR5282, Université Toulouse III, 31024 Toulouse, France

3 Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, CHU Toulouse, France

*** Equally contributed**

§ Correspondence should be addressed to

Jean Michel Mansuy (corresponding author)

Laboratoire de Virologie, Institut Fédératif de Biologie, 330 avenue de Grande

Bretagne, 31059 Toulouse cedex France

Tel: 33 5 676 90 418

Fax: 33 5 676 90 425

Email: mansuy.jm@chu-toulouse.fr

or Nabila Jabrane-Ferrat (alternate author)

Centre de Physiopathologie Toulouse-Purpan, INSERM U1043, CNRS UMR5282,

Université Toulouse III, 31024 Toulouse, France

Tel: 33 5 627 44 537

Fax: 33 5 676 90 425

Email: nabila.jabrane-ferrat@inserm.fr

26 **Short title:** ZIKA RNA, cytokines in semen and plasma

27 **Key words:** ZIKA, cytokines, semen, blood, inflammation

28 **Word count abstract:** 61

29 **Word count text:** 806

30 **A two-sentence biography:** Dr. Mansuy is a medical virologist at the University

31 Hospital of Toulouse, France. His research interests include emerging viral diseases,

32 respiratory and enteric diseases.

33

34 **Abstract:**

35 We longitudinally studied Zika virus (ZIKV) RNA and a selected panel of cytokines in
36 semen and plasma in a ZIKV infected patient. ZIKV RNA was detected in semen
37 more than two months after the viremia disappearance and patterns of cytokines
38 were different in semen and plasma. These results reinforce the hypothesis of a
39 compartmentalization of ZIKV in the male genital tract.

40

41 ZIKA virus (ZIKV) is an enveloped single strand positive sense RNA virus that
42 belongs to the *Flaviviridae* family. Since its discovery, ZIKV infection was associated
43 only with mild symptoms. However, the recent outbreak revealed that the infection
44 can lead to severe clinical manifestations particularly for fetuses and newborns (1).
45 Furthermore, detection of replicative virus in the semen along with sexual
46 transmission resulted in a paradigm shift in ZIKA virology (2, 3).
47 Several animal models were developed and revealed that ZIKV persistence within
48 the male reproductive tract (MRT) resulted in diminished testosterone and
49 oligospermia (4). However, the consequences of ZIKV infection on the human MRT
50 remains poorly understood because of complex ethical considerations. In order to
51 shed some light on this issue, we evaluated the ZIKV load and the immunological
52 profile in blood/plasma and semen of a 32 year-old immunocompetent male who
53 experienced a benign ZIKV infection acquired in South America.
54 We report here a longitudinal six month-follow up study of viral RNA in blood and
55 semen (5) and a selected panel of innate immune mediators (IFN- γ , IL-15, IFN- β),
56 inflammation (IL-6, IL-18, sICAM-1), chemotaxis (CCL-3, CCL-4, CXCL-1, CXCL-8
57 and CXCL-10), hematopoiesis (G-CSF, GM-CSF), angiogenesis (VEGF-A) and
58 proteases (MMP-2, MMP-9) (ProcartaPlex®, ebioscience) in plasma. Plasma and
59 semen samples from a healthy age-matched male without any risk factor for an acute
60 or a chronic infection were used as control. Both patient and control are Caucasians
61 and live in the same geographical area. At the admission, the ZIKV-infected patient
62 had moderate fever, maculopapular rash, myalgia, and arthralgia and recovered in
63 few days. The patient was HIV negative, the diagnosis of dengue and chikungunya
64 were ruled out thanks to the absence of serological and molecular markers.

65 Furthermore, he did not suffer from any other genital or urinary tract infections during
66 the entire study.

67 Two days after the onset of symptoms, ZIKV RNA was much higher in semen (1.04×10^5 copies/ml) than whole blood (9.4×10^3 copies/ml). Viremia was cleared within
68 100 days whereas viral RNA was detected in semen up to 168 days. In response to
69 ZIKV infection, soluble factors secretion can be stratified in three profiles (Figure).

70 The first profile is associated with a surge of pro-inflammatory cytokines in semen (IL-
71 6, IFN- γ , CCL-3 and CCL-4) and plasma (CCL-3, CXCL-10 and VEGF-A) at early
72 stages of ZIKV infection. These cytokines returned to basal level over time. The
73 second one, mainly in semen, is characterized by a decrease of CXCL-1, CXCL-8,
74 CXCL-10 and VEGF-A production in the early onset of the infection followed by a
75 progressive return to normal levels that coincided with viral clearance. The last profile
76 includes factors with sustained abnormal levels in semen (IL-18, sICAM-1, MMP-2
77 and G-CSF) and plasma (CCL-3, CXCL-1, sICAM-1, MMP-2 and MMP-9), even after
78 complete clearance of viral RNA. Some factors (IL-15, IFN- β and GM-CSF) were
79 undetectable in plasma and semen while others (IL-6, IFN- γ , CCL-4, CXCL-8 and G-
80 CSF) were only absent or barely detected in plasma.

81 Our data revealed higher amounts and prolonged viral RNA shedding in semen than
82 blood samples. Furthermore, ZIKV infection not only alters cytokine secretion but
83 also exhibits a distinct profile within plasma and semen samples with a more
84 prominent effect in semen. The discrepancies in cytokine amounts and kinetics
85 between semen and plasma, along with viral load, are suggestive of viral
86 compartmentalization. Accordingly, further studies are urgently needed to understand
87 the mechanism involved in the establishment of such compartment and develop
88 efficient anti-viral therapies that impair viral replication beyond the organ barriers.
89

Cytokines produced in the MRT not only constitute natural components of seminal plasma but also reflect the local immune status, organ function and damage. The high levels of pro-inflammatory factors in semen from ZIKV-infected patient illustrate the exacerbated local immune response established to control ZIKV infection. Such response might lead to new targets and/or inflammatory cells recruitment further amplifying viral replication and organ injury (6). Down regulation of several factors further highlight these damages. For instance, VEGF-A levels in our study mirror the impairment of spermatogonia, primary spermatocytes and Sertoli functions upon ZIKV infection (4). On the other hand, the decrease of CXCL-1, CXCL-8 and CXCL-10 chemokines in semen all along infection could witness a local immunosuppressive state induced by the virus and limiting immune cells infiltration in the male genital tract. Such a decrease could also limit virus dissemination throughout the body. The different kinetics between viral RNA and cytokine profile in seminal samples raises questions about taking into account the semen secretome in case of couples aiming at conception and the necessity to extend the convalescence period beyond ZIKV recovery.

In fact, at high concentration, most of these factors might alter the integrity of the mucosal barriers within the female reproductive tract and increase the susceptibility to pathogens infection (7). Furthermore, they can promote the peroxidation process and affect sperm function with subsequent infertility (8).

The limitations of our results are linked to the singleness of the healthy control and warrant further investigations including larger cohort of patients and healthy controls. In summary, the profound disruption in the cytokine network is evident in plasma and semen from the earliest stage of ZIKV-infection and is maintained overtime even after viral clearance.

115 **Conflict of interests:** All authors do not have a commercial or other association that
116 might pose a conflict of interest.

117

118 **Sources of financial support:** none

119

120 **Acknowledgment:** We thank Isabelle Da Silva (Virology laboratory) for technical
121 assistance.

122

123 **References**

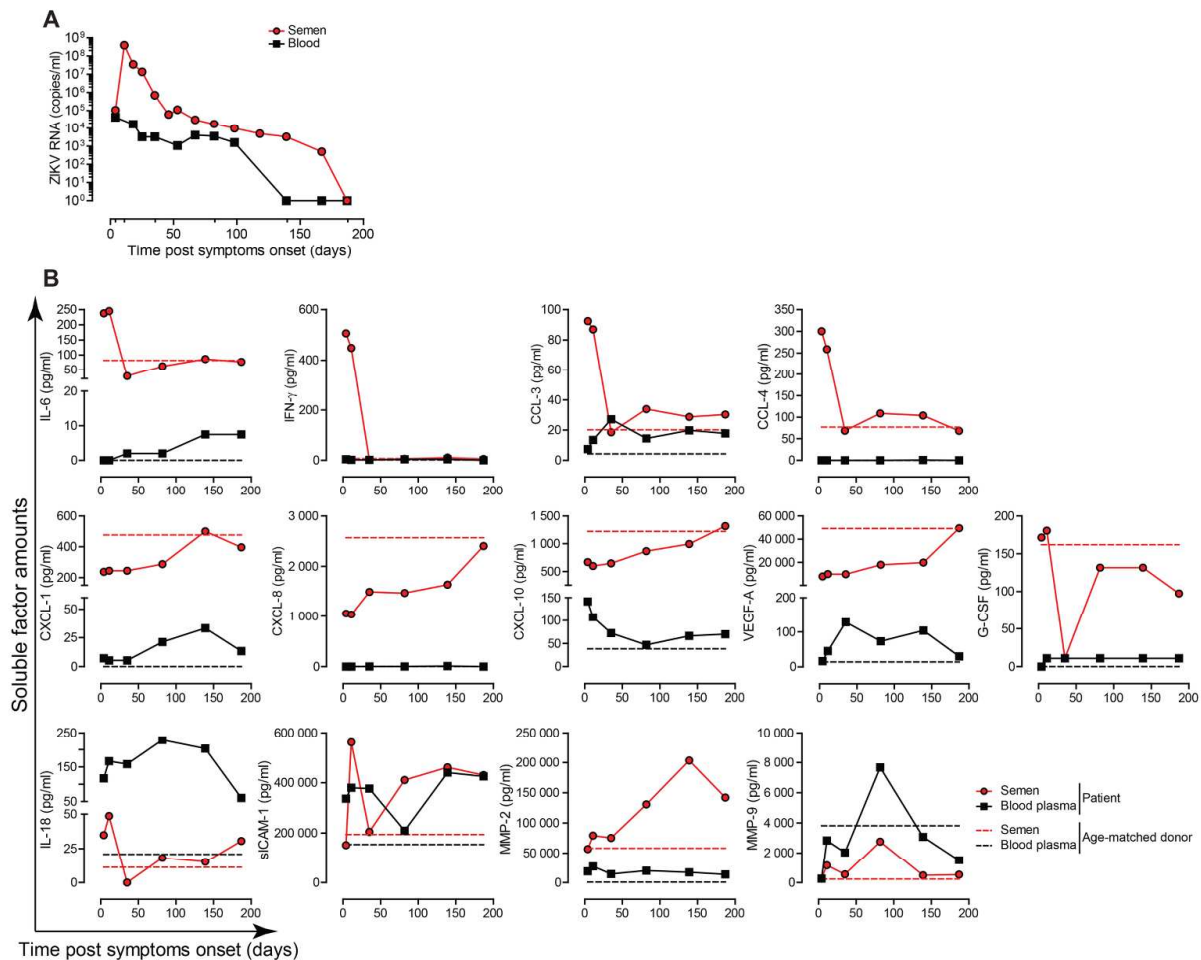
- 124 1. Brasil P, Pereira JP, Jr., Moreira ME, Ribeiro Nogueira RM, Damasceno L, Wakimoto M, et al.
 125 Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *N Engl J Med*. 2016 Dec 15;375(24):2321-
 126 34.
- 127 2. Baud D, Musso D, Vouga M, Alves MP, Vulliemoz N. Zika virus: A new threat to human
 128 reproduction. *Am J Reprod Immunol*. 2017 Feb;77(2).
- 129 3. Mansuy JM, Suberbielle E, Chapuy-Regaud S, Mengelle C, Bujan L, Marchou B, et al. Zika virus
 130 in semen and spermatozoa. *Lancet Infect Dis*. 2016 Oct;16(10):1106-7.
- 131 4. Govero J, Esakky P, Scheaffer SM, Fernandez E, Drury A, Platt DJ, et al. Zika virus infection
 132 damages the testes in mice. *Nature*. 2016 Dec 15;540(7633):438-42.
- 133 5. Joguet G, Mansuy JM, Matusali G, Hamdi S, Walschaerts M, Pavili L, et al. Effect of acute Zika
 134 virus infection on sperm and virus clearance in body fluids: a prospective observational study. *Lancet*
 135 *Infect Dis*. 2017 Nov;17(11):1200-8.
- 136 6. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev*
 137 *Immunol*. 2011 Oct 10;11(11):762-74.
- 138 7. Rametse CL, Olivier AJ, Masson L, Barnabas S, McKinnon LR, Ngcapu S, et al. Role of semen in
 139 altering the balance between inflammation and tolerance in the female genital tract: does it
 140 contribute to HIV risk? *Viral Immunol*. 2014 Jun;27(5):200-6.
- 141 8. Fraczek M, Sanocka D, Kamieniczna M, Kurpisz M. Proinflammatory cytokines as an
 142 intermediate factor enhancing lipid sperm membrane peroxidation in in vitro conditions. *J Androl*.
 143 2008 Jan-Feb;29(1):85-92.

144

145 **Figure legend**

146 Cytokine profiles during Zika virus. (A) Kinetics of Zika virus RNA detection in whole
147 blood (black squares) and semen (red circles) quantified by real-time PCR. (B)
148 Quantification of soluble factors in the blood plasma (black squares) and in the
149 semen (red circles) at 4, 11, 35, 82, 139 and 187 days after symptom onset.
150 Specific amounts of cytokines, chemokines, growth factors and metalloproteinases
151 are given in the Y axes.
152 Dashed lines represent base line level of soluble factors quantified in blood plasma
153 (black) and semen (red) obtained from an age-matched healthy donor.

Figure 1



Cytokine profiles during Zika virus. (A) Kinetics of Zika virus RNA detection in whole blood (black squares) and semen (red circles) quantified by real-time PCR. (B) Quantification of soluble factors in the blood plasma (black squares) and in the semen (red circles) at 4, 11, 35, 82, 139 and 187 days after symptom onset. Specific amounts of cytokines, chemokines, growth factors and metalloproteinases are given in the Y axes. Dashed lines represent base line level of soluble factors quantified in blood plasma (black) and semen (red) obtained from an age-matched healthy donor.

205x205mm (300 x 300 DPI)

Infections virales par l'Hépatite E et Zika : Pathogenèse à l'interface mère-fœtus et Rôle de la réponse immune

Durant la grossesse, le fœtus est séparé de la mère par le placenta qui constitue une barrière protectrice efficace. Cependant, cette barrière n'est pas totalement imperméable et permet de nombreux échanges (nutriments, hormones, déchets, ...) dans des zones bien spécifiques nommées interfaces materno-fœtales. Au niveau de ces zones, les cellules fœtales entrent en contact direct avec le sang et les tissus maternels. Parmi ces interfaces, on trouve notamment la *decidua basalis* (paroi de l'endomètre gestant) où les villosités chorionales du placenta s'ancrent profondément et l'espace intervilloux où les villosités flottantes sont baignées par le sang maternel. L'accès au placenta au niveau de ces interfaces est un processus finement régulé par de nombreux mécanismes. Cependant, certains pathogènes qui infectent la mère peuvent détourner ces mécanismes, franchir la barrière placentaire et se disséminer au fœtus. La famille des pathogènes TORCH (Toxoplasmosis, Others, Rubella, Cytomegalovirus et Herpes) est la plus connue pour induire des infections congénitales. Cependant d'autres virus moins connus ou émergents sont aussi capables d'infecter les interfaces mère-fœtus et de causer des complications graves pouvant être fatales pour la mère et le fœtus. Parmi ces virus, on retrouve notamment le virus de l'Hépatite E (VHE) et le virus Zika (ZIKV).

C'est dans ce contexte que s'insèrent mes travaux de thèse qui s'articulent autour de trois axes. Dans la première partie de ma thèse, nous nous sommes intéressés à la pathogenèse du VHE et du ZIKV à l'interface mère-fœtus en identifiant les cibles cellulaires des virus et en caractérisant les conséquences fonctionnelles de l'infection. Dans la seconde partie, nous avons étudié la fonction des cellules Natural Killer déciduales (dNK), qui représentent 30% des cellules de la *decidua basalis*. Ces cellules dNK ne sont pas cytotoxiques durant une grossesse physiologique mais elles sécrètent de nombreux facteurs solubles essentiels au bon déroulement de la grossesse. Nous avons démontré que les fonctions effectrices des cellules dNK sont directement régulées et dictées par le microenvironnement déciduel. De plus, nous avons découvert que les cellules dNK sont capables de détecter et de limiter l'infection des cellules stromales déciduales par le ZIKV. Enfin, dans la dernière partie, nous nous sommes intéressés à la pathogenèse de l'infection par le VHE dans un autre groupe de patients à haut risque de formes graves, les personnes âgées. Nous avons alors mis en évidence que le développement de formes sévères est associé à l'émergence d'une population de lymphocytes T CD8 caractérisée par un fort état d'activation associé à des défauts fonctionnels.

En conclusion, mes travaux de thèse ont permis de mieux comprendre la pathogenèse du VHE et du ZIKV durant la grossesse et au-delà. De plus, ils ont participé à prouver l'importance du microenvironnement local dans le contrôle de la plasticité des cellules immunitaires.

Mots clé : Interfaces materno-fœtales ; Infection congénitale ; Réponse immunitaire ; Lymphocytes Natural Killer et T CD8 ; Virus de l'Hépatite E et Zika.

Hepatitis E and Zika viral infections: Pathogenesis at the maternal-fetal interface and Interplay with the immune response

During pregnancy, the fetus is isolated from the mother by the placenta, which constitutes an efficient protective barrier. However, this barrier is not completely impermeable and allows various exchanges (nutrients, hormones, wastes ...) in specific areas called maternal-fetal interfaces. In these areas, fetal cells are in direct contact with maternal blood and tissues. Among these interfaces, we can distinguish the *decidua basalis* (gestating endometrium wall) where the placental chorionic villi are deeply anchored, and the intervillous space where the floating villi bathe in the maternal blood. The access to the placenta is a process tightly regulated by different mechanisms. However, some pathogens that infect the mother can subvert these mechanisms, cross the placental barrier, and spread to the fetus. The family of TORCH pathogens (Toxoplasmosis, Others, Rubella, Cytomegalovirus and Herpes) is best known for inducing such congenital infections. Alternatively, other less known or emerging viruses like Hepatitis E virus (HEV) and Zika virus (ZIKV) are also able to infect the maternal-fetal interface and cause severe outcomes that can be lethal for both the mother and the fetus.

It's in this context that fit my thesis work, articulated around three research axes. In the first part of my work, we focused on the pathogenesis of HEV and ZIKV at the maternal-fetal interface by identifying the cellular targets of the viruses and deciphering the functional consequences of their infection. Then, we studied the role of the decidual Natural Killer (dNK) cells, which account for 30% of total cells within the *decidua basalis*. These dNK cells are devoid of cytotoxic function in healthy conditions but they rather secrete various soluble factors that are essential for the success of pregnancy. In the second part of my work, we demonstrated that the decidual microenvironment dictates and regulates the effector functions of dNK cells. Moreover, we found that dNK cells are able to detect and limit the infection of decidual stromal cells by ZIKV. Finally, in a last part, we investigated the pathogenesis of HEV infection in another group of patients at high risk of developing serious forms, the elderly people. Thus, we highlighted that the development of severe forms is associated with the emergence of a population of CD8 T cells characterized by a high activation status associated with functional defects.

In conclusion, my thesis work has shed light on the pathogenesis of HEV and ZIKV during pregnancy and beyond. In addition, they helped to demonstrate the importance of the local microenvironment in controlling the plasticity of immune cells.

Keywords : Maternal-fetal interfaces ; Congenital infection ; Immune Response ; Natural Killer and CD8 T Lymphocytes ; Hepatitis E and Zika viruses.